

Chemoenzymatische Synthese funktioneller Sialokonjugate



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Ning He

aus Shaanxi (V.R. China)

Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Wolf-Dieter Fessner
Korreferent:	Prof. Dr. rer. nat. Harald Kolmar
Tag der Einreichung:	31.10.2011
Tag der mündlichen Prüfung:	12.12.2011

Darmstadt 2012

D17

Für meine Eltern und meinen Mann

天道酬勤

Danksagung

Herrn Professor Dr. W.-D. Fessner danke ich für die interessante Themenstellung, der steten Bereitschaft zur Diskussion und den vielen nützlichen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Herrn Professor Dr. H. Kolmar danke ich für die freundliche Übernahme der Mitberichterstattung.

Herrn Professor Dr. A. Berry danke ich für die Überlassung der CSS-Mutanten, für die Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen.

Ferner möchte ich den Mitarbeitern der Serviceabteilung, Frau K. Jungk, Herrn K.-O. Runzheimer und Herrn Dr. R. Meusinger für die NMR-Spektroskopie, sowie Frau Ch. Rudolph für die Massenspektrometrie danken.

Herrn Dr. J. Schooren danke ich für die Unterstützung bei der Korrektur des Manuskripts.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich mich für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei der Erweiterung meiner Deutschkenntnisse bedanken. Besonders danke ich Herrn H.-M. Orfgen für die ständige Hilfe beim Umgang mit den Computern und der Produktaufreinigung bzw. MALDI-TOF-MS-Analyse. Ich danke Herrn M.Sc. D. Yi für die Überlassung der Sialyltransferase, und Herrn M. Kickstein für die Hilfe im biologischen Bereich. Herrn Dipl.-Ing. D. Heyl danke ich für die stetige Diskussionsbereitschaft. Frau Dr. M. Rale und Herrn Dr. T. Devamani danke ich für die Verbesserung meiner Englischkenntnisse. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dipl.-Ing. E. Heilig, Frau Dipl.-Chem. D. Güclü, Herrn Dipl.-Ing. M. Schnellbacher, Herrn Dipl.-Chem. T. Scheid, Herrn Dipl.-Biochem. S. Kühl, Herrn Dipl.-Biochem. S. Junker und Frau B. Harnischfeger für ihre ständige Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Mann für ihre große Unterstützung und ihre Geduld mit mir bedanken.

Veröffentlichungen und Präsentationen

N.He, D. Yi, W-D. Fessner, "Flexibility of Substrate Binding of Cytosine-5'-Monophosphate-N-Acetylneuraminate Synthetase (CMP-Sialate Synthetase) from *Neisseria meningitidis*: An Enabling Catalyst for the Synthesis of Neo-sialoconjugates" *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, 353, 2384-2398.

Posterpräsentation; *Biotrans 2009, Jul. 2009, Berne, Switzerland*:

N. He, W-D. Fessner, "Chemoenzymatic Synthesis of New Fluorescent Sialyl Conjugates"

Posterpräsentation; *ECOST-MEETING-CM0701-080910-002326, Sep. 2010, Vilnius, Lithuania*:

N. He, D. Yi, W-D. Fessner, "Screening for Substrate Tolerance of Enzymes – Development of a pH based high-throughput Screening Assays"

Vortrag: *ECOST-MEETING-CM0701-080910-002326, Sep. 2010, Vilnius, Lithuania*:

"Chemoenzymatic Synthesis of Novel Sialic acid Conjugates"

Posterpräsentation; *Biotrans 2011, Okt. 2011, Sicily, Italy*:

N. He, W-D. Fessner, "Sialyltransferase Catalyzed Runaway Block Polymerization: One-pot Synthesis of neo-Glycopolymers Containing α 2,6-Sialyllactose Repeating Units"

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	5
1.1. Sialinsäuren und Sialokonjugate	5
1.2. Synthese von Sialokonjugaten	11
1.2.1. Enzymatische Synthese von Sialinsäuren	13
1.2.2. Enzymatische CMP-Aktivierung von Sialinsäuren	16
1.2.3. Enzymatischer Sialyltransfer	19
2. Zielsetzung	23
3. Allgemeiner Teil	26
3.1. Chemoenzymatische Synthese von funktionellen Sialinsäuren	26
3.1.1. Chemische Synthese von Aldolase-Substraten	26
3.1.2. Enzymatische Synthese von neuen funktionellen Sialinsäuren mit der N-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA)	39
3.1.3. Chemische Modifizierung von Sialinsäuren	43
3.2. CMP-Aktivierung durch die CMP-Sialat-Synthetase: Entwicklung einer neuen Assay- Methode und präparative Anwendungen	48
3.2.1. Literaturübersicht zu bekannten Assay-Methoden	48
3.2.2. Entwicklung einer neuen photometrischen Assay-Methode	51
3.2.3. Kinetische Bestimmung der Substrattoleranz der CSS mit Neu5Ac und verschiedenen Substratanaloga	60
3.2.4. Kinetische Studien mit verschiedenen CSS-Mutanten	72
3.2.5. Anwendungen der CSS für präparative Aktivierung nicht-natürlicher Sialinsäuren	78
3.3. Fluoreszenzmarkierung biologischer Komponenten durch Sialyltransferase	85
3.3.1. Einleitung	85
3.3.2. Synthese und CSS-katalysierte Aktivierung von Fluoreszenz-verlinkten Sialinsäuren	89
3.3.3. Synthese vielseitig verwendbarer Sialylakzeptoren	97

3.3.4. Synthese neuartiger Sialokonjugate.....	106
3.3.5. Versuche zur Übertragung fluoreszenzmarkierter Sialinsäuren auf Erythrozyten...	116
3.4. Synthese von Oligosacchariden mit internen Sialinsäuren.....	119
3.4.1. Synthese und Aktivierung von Akzeptor-konjugierten Sialinsäure-Donoren.....	119
3.4.2. Enzymatische Block-Polymerisation durch gekoppelte Eintopf-Reaktion mittels CSS und α 2,6-SiaT.....	125
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	137
4.1. Enzymatische Synthese von Sialinsäuren.....	137
4.2. Entwicklung einer neuen kontinuierlichen Assay-Methode für die CMP-Sialat-Synthetase.....	138
4.3. Enzymatische Synthese von neuartigen Sialokonjugaten mittels Kaskaden-Reaktionen.....	140
4.4. Herstellung fluoreszenzmarkierter Erythrozyten.....	141
4.5. Blockpolymerisation in Ein-Topf-zwei-Enzym-System.....	144
5. Experimenteller Teil.....	147
5.1. Allgemeine Bemerkungen.....	147
5.2. Herstellung der CMP-Sialat-Synthetase (CSS).....	149
5.2.1. Fermentation.....	149
5.2.2. Zellaufschluss.....	150
5.2.3. Reinigung der CSS.....	150
5.3. Kinetische Analyse der CSS mittels pH-Indikator-Assay.....	151
5.3.1. Optimale Wellenlänge und benötigte Indikator-Konzentration.....	151
5.3.2. Zusammenhang zwischen Entstehung von Protonen und Absorptionsänderung.....	151
5.3.3. Optimale Konzentration des Mg^{2+} -Cofaktors.....	152
5.3.4. Bestimmung von Bindungsaffinitäten.....	152
5.4. Synthesen.....	154
5.4.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	154
5.4.2. Präparative Synthesen.....	163
6. Literaturverzeichnis.....	384

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
Acridon/Acr	10 <i>H</i> -Acridin-9-OH
AgOTf	Silbertriflat
Äq.	Äquivalent
Ausb.	Ausbeute
Bn	Benzyl
BuOH	Butanol
C	Chloroform
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
CIAP	alkalische Phosphatase
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidin-5'-monophosphat- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
CSS	CMP-Sialat-Synthetase
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
CuAAC	Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions (Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition)
Cy	Cyclohexan
Cy.	Cytidin
δ	Chemische Verschiebung
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett-Dublett
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzyme Comission (einheitliche Klassifizierung von Enzymen)

	nach Enzymklassen und –nummern)
EE	Essigsäureethylester
ESI-MS	Elektronensprayionisation-Massenspektrometrie
Et ₃ N	Triethylamin
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalT	β-1,4-Galactosyltransferase
ges.	gesättigt
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunde(n)
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
HV	Hochvakuum
i. Vak.	im Vakuum
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kap.	Kapitel
<i>k_{cat}</i>	katalytische Geschwindigkeit
<i>k_{cat}/K_M</i>	katalytische Effizienz
KDN	3-Deoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -2-nonulosonsäure
<i>K_M</i>	Michaelis-Menten-Konstante (Substrataffinität)
konz.	konzentriert
Lac	Lactose
Leg	Legionaminsäure
LM	Laufmittel
m	Multiplett
Man	Mannose
ManNAc	N-Acetylmannosamin
ManNH ₂	D-Mannosamin
M/MeOH	Methanol
min.	Minute
mM	mmol/L

Na-Ascorbat	Natriumascorbat
NAD ⁺	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
NaOMe	Natriummethanolat
NeuA	Neuraminsäure-Aldolase
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
NeuS	Neuraminsäure-Synthase
NH ₂ -	Amino-
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (magnetische Kernresonanz)
OAc	Acetat
OD _{λ = 547 nm}	Absorptionsdaten bei Wellenlänge 574 Nanometer
OH	Hydroxyl
PEP	Phosphoenolpyruvat
PhAc	Phenylacetyl
P _i	anorganisches Phosphat
pK _a	der negative dekadische Logarithmus der Säurekonstante (K _a)
PP _{ase}	anorganische Pyrophosphatase
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
PSA	Polysialinsäure
Pse	Pseudaminsäure
R _f	Rückhaltefaktor
RhoB-Cl	Lissamin-Rhodamin-B-sulfonylchlorid
RP	reversed phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
RZ	Reaktionsdauer
s	Singulett
Sia	Sialinsäure
SiaT	Sialyltransferase
t	Triplett
THF	Tetrahydrofuran
TMSCl	Trimethylsilanchlorid
TMS	Tetramethylsilan
TMSOTf	Trimethylsilyltriflat

Tos	para-Toluolsulfonyl
TrCl	Tritylchlorid
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit (1 Unit = 1 μ mol Umsatz/min)
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDP-Gal	Uridin-5'-diphosphat- α -D-Galactopyranosid
UDP-Gal-4-epimerase	Uridin-5'-diphosphat –Galactose-4-epimerase
UDP-Glc	Uridin-5'-diphosphat- α -D-Glucopyranosid
V_{\max}	maximale Geschwindigkeit
WW	Wechselwirkung
*	getrocknet

1. Einleitung

1.1. Sialinsäuren und Sialokonjugate

Sialinsäuren (Sia) sind für das Leben wichtige Moleküle und bilden eine große Familie von 9-Kohlenstoff-Zuckern mit einer α -Ketonsäurefunktionalität.^[1] Erstmals wurde die 5-Acetamido-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure (*N*-Acetylneuraminsäure, Neu5Ac) als wichtigste Sialinsäure 1936 von *Blix* durch milde Säure-Hydrolyse aus dem Speicheldrüsen-Mucin des Rindes in kristalliner Form gewonnen.^[2, 3] In den 1940er-Jahren hat *Klenk* das Neuraminsäure- β -methyl-Glycosid durch Methanolyse eines Gangliosids erhalten.^[4] Seitdem wurden mehr als 50 verschiedene Sialinsäuren und Derivate in der Natur gefunden, davon mehr als 15 Strukturen in menschlichen Erythrozyten, Speichel-Proteinen und Magen-Darm-Mucinen.^[5, 6] Die vier grundlegenden Sialinsäure-Formen (Abb. 1) sind die Neu5Ac, eine desaminierte Form der Neuraminsäure (3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure, KDN),^[7, 8] die *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc)^[9] sowie die nicht *N*-acylierte Neuraminsäure (Neu).

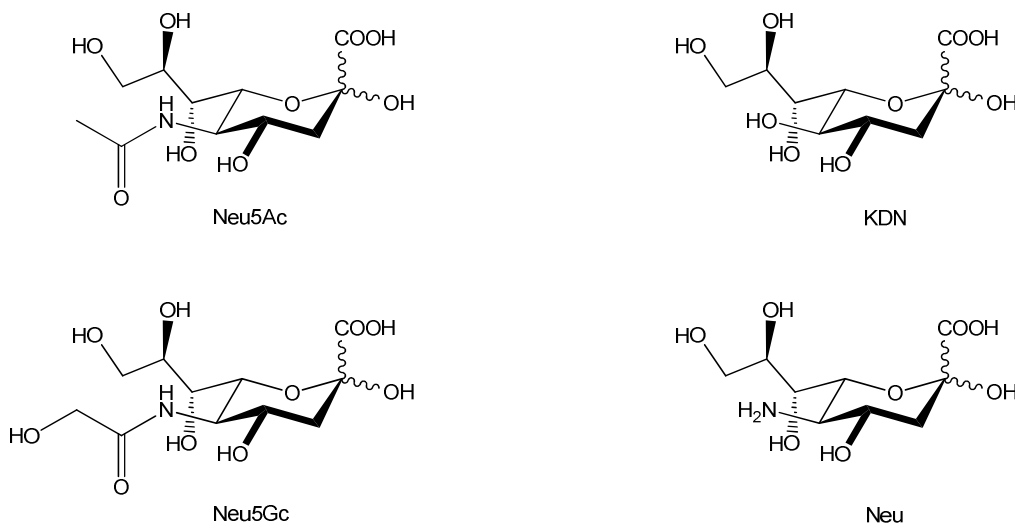
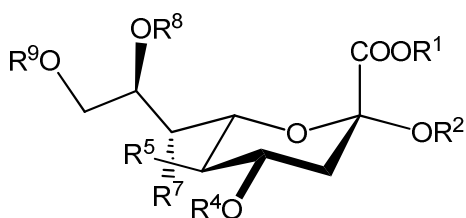


Abb. 1: Die vier grundlegenden Sialinsäure-Formen.

Davon ist die Neu5Ac die am häufigsten vorkommende Sialinsäure-Komponente von Glycokonjugaten in verschiedenen biologischen Arten.^[8, 10] Die zweithäufigste in der Natur

vorkommende Sialinsäure ist KDN, die an Position C-5 anstelle der *N*-Acetyl-Gruppe eine Hydroxyl-Gruppe besitzt. Nach ihrer Entdeckung in den Oozyten der Regenbogenforelle in 1986^[11] wurde KDN inzwischen in verschiedenen Organismen von Bakterien bis niederen Wirbeltieren und Säugetier-Geweben identifiziert.^[12] Ebenfalls weit verbreitet ist Neu5Gc, eine Sialinsäure mit einer hydroxylierten *N*-Acetyl-Gruppe an C-5 Position, die erstmals von Blix beschrieben wurde.^[13] Im Vergleich mit Neu5Ac und KDN kommt Neu5Gc normalerweise nicht in menschlichen Zellen, dagegen häufig in tierischen Organismen vor.^[14] Neu5Gc wird aus CMP-Neu5Ac durch die enzymatische Insertion eines Sauerstoff-Atoms an der *N*-Acetyl-Gruppe unter Katalyse der CMP-Neu5Ac-Hydroxylase erzeugt, die beim Mensch keine Funktion besitzt.^[15] Neu5Gc lässt sich in bestimmten Krebsformen auf der Tumorzelloberfläche und auch auf fötalen Zellen detektieren,^[16, 17] und wurde als Krebs-Marker vorgeschlagen. Die freie Neuraminsäure (Neu) mit unsubstituierter Amino-Gruppe wurde als eine basische Sialinstruktur nur in bestimmten Glykokonjugaten von Wirbeltieren detektiert und kann durch enzymatische Deacetylierung aus Neu5Ac erhalten werden.

In der Natur werden die weiteren strukturellen Sialinsäure-Modifikationen (Abb. 2) durch *O*-Acetylierung, *O*-Methylierung, *O*-Lactoylierung, *O*-Sulfatierung oder Phosphorylierung aus den vier primären Sialinsäuren (Neu5Ac, KDN, Neu5Gc, Neu) an den Positionen C-4, C-5, C-7, C-8 und C-9 erreicht.^[1, 8] Man vermutet, dass solche Modifikationen postsynthetisch in Sialylglykokonjugaten oder Polysialinsäuren bei Säugetieren,^[18, 19] bei *Meningococci* der Gruppe C^[20] und bei *E. coli*^[21] auftreten. Die C-1-Carbonsäure-Gruppe ist üblicherweise bei physiologischem pH ionisiert, kann aber auch mit intra- oder intermolekularen Hydroxygruppen zum Lacton oder mit einer freien Amino-Gruppe (z.B. Neu) an C-5 zu einem intermolekularen Lactam kondensieren.



- R¹ = H (Dissoziation bei physiologischem pH); Kondensation mit inter- oder intra-OH-Gruppe zu Lacton bzw. mit C5-NH₂-Gruppe zu Lactam
 R² = H, α -Verknüpfung mit Gal, GalNAc, GlcNAc oder Sia
 R⁴ = H, Acetyl, Fuc, Gal
 R⁵ = NH₂, *N*-Acetyl, *N*-Glycolyl, OH oder Derivaten
 R⁷ = NH₂, OH, *O*-Acetyl
 R⁸ = H, Acetyl, Sulfat, Methyl, Sia, Glc
 R⁹ = H, Acetyl, Lactoyl, Phosphat, Sulfat, Sia

Abb. 2: Natürlich vorkommende Sialinsäure-Modifikationen in α -Konfiguration.

Als einzige ungesättigte Sialinsäure wurde 2-Desoxy-2,3-didehydro-Neu5Ac (Neu2en5Ac, Abb. 3) gefunden, allerdings wegen des Fehlens einer konjugationsfähigen α -Keto-Gruppe nur in freier Form.^[22] Die Legonaminsäure (Leg, Abb. 3) tritt in Lipopolysacchariden von *Legionella pneumophila* auf und ist wegen des Vorliegens einer identischen Konfiguration (D-glycero-D-galacto) wie in Neu5Ac und KDN eine echte Sialinsäure.^[23] Die Pseudaminsäure (Pse, Abb. 3), eine Verbindung mit C9-Gerüst, die in Lipopolysacchariden von *Pseudomonas* gefunden wurde, ist wegen ihrer L-glycero-L-manno-Konfiguration ein Stereoisomer von Sialinsäuren.^[23] Die beiden letzteren Substanzen werden analog zur Biosynthese von Neu5Ac jeweils mit Hilfe einer spezifischen Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängigen Synthase erzeugt.^[23]

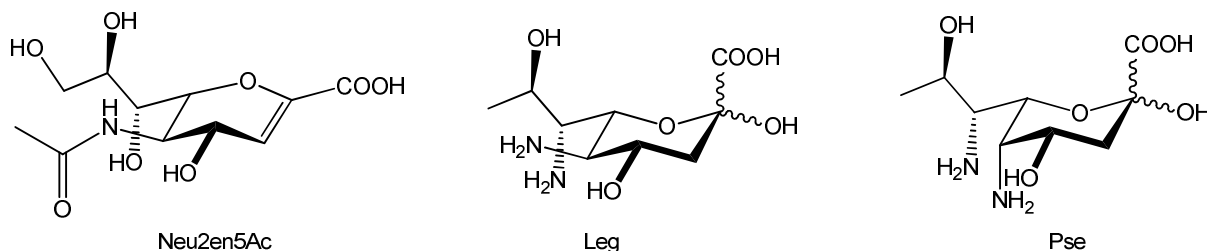


Abb. 3: Einige neuere Vertreter der Sialinsäure-Familie.

In der Natur werden Sialinsäuren üblicherweise als terminale Bausteine von Glycoproteinen und Glycolipiden in Wirbeltieren und einigen höheren Wirbellosen oder als Komponente der Zelloberfläche in bestimmten Bakterien gefunden.^[8] Jedoch treten sie im Unterschied zu anderen Monosacchariden nicht in Pflanzen auf. Sialinsäuren liegen üblicherweise als Pyranose-Ringstruktur mit einer ²C₅-Sesselkonformation vor.^[24] Als Komponenten von Glycokonjugaten sind Sialinsäuren dabei in der Natur in der α -Konfiguration (C2-O ist äquatorial), freie Sialinsäuren in Lösung jedoch hauptsächlich in der β -Konfiguration (C2-O ist axial) vorzufinden (Abb. 2).^[25] Über intermediär gebildete CMP-aktivierte Sialinsäuren in β -Konfiguration als Donor werden die Sialinsäuren α -selektiv mit anderen Zuckern mit Hilfe einer spezifischen Sialyltransferase verbunden (Abb. 2). In den meisten Fällen wird die Sialinsäure als terminales Kohlenhydrat mit dem Glykan auf der Zelloberfläche von Säugetieren über α 2,3- und α 2,6- an eine Galactose-Einheit, über α 2,6- an einen N-Acetylgalactosamin-Rest oder auch über eine α 2,8-Verknüpfung an andere Sialinsäure-Reste gekoppelt.^[26] Die α 2,3-Verknüpfung an GalNAc,^[27, 28] α 2,6-, α 2,4-Verknüpfung an GlcNAc,^[29, 30] α 2,4-Verknüpfung an Gal^[31] oder α 2,9-Verknüpfung zu anderen Sialinsäuren^[32] sind vereinzelt in tierischen Geweben postuliert worden. Sialinsäuren können auch eine interne

Position innerhalb eines Glykans besetzen. So wurde berichtet, dass die Sialinsäuren Neu5Ac, Neu5Gc, KDN oder Leg in Form von Polysialinsäuren, meistens mit α 2,8-Verknüpfung, in bestimmten tierischen Glycoproteinen auftreten können.^[23] Die Kapsel-Polysaccharide oder Lipopolysaccharide bestimmter pathogener Bakterien enthalten ebenfalls interne Sialinsäuren, z.B. Neu5Ac oder KDN als Anteil von sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten, wie z.B. $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpN}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}(1\rightarrow 7)\text{-}\alpha\text{-D-Neup5Ac}(2\rightarrow)]$ als Wiederholungseinheit im O-Antigen von *Salmonella arizonae* O21^[33] oder $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Ribf}(1\rightarrow 9)\text{-}\alpha\text{-D-KDNp}(2\rightarrow)]$ als Wiederholungseinheit in der Zell-Membran von *Sinorhizobium freiddi* SVQ293.^[34] Diese ionischen Polysaccharide sind wichtige pathogene Virulenzfaktoren und könnten z.B. für bestimmte therapeutische Ziele als effektive Impfmittel gegen Bakterien, *Neisseria meningitidis* Gruppe A, C, Y und W135, eingesetzt werden.^[35]

Aufgrund ihrer anionischen Ladung und exponierten Stellung sind Sialinsäuren bei verschiedenen wichtigen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Auf der äußeren Zell-Membran kommen Sialinsäuren in hoher Dichte vor, z.B. mehr als 10 Millionen Sialinsäure-Einheiten pro menschlichem Erythrozyt. Die relativ starke elektronegative Ladung von Sialinsäuren kann Ionentransporte durch die Zellmembran, die Stabilität der Konformation von Proteinen, einschließlich Enzymen und die Viskosität von Muzin vergrößern.^[36] Sialinsäuren können auch Moleküle und Zellen gegen den Angriff von Proteasen oder Glycosidasen schützen, die Affinität von Rezeptoren regulieren und verschiedene Prozesse wie transmembrane Signalwirkung, Befruchtung, Wachstum und Zellteilung modulieren, z.B. kann die Apoptose durch O-Acetylierung von Sialinsäure inhibiert werden.^[23]

Sialinsäuren haben zwei gegensätzliche Eigenschaften, einerseits als biologische Maske für biologische Erkennungsstellen,^[37] andererseits als eigenständige, spezifische Epitope.^[38]

Als biologische Maske können sie wichtige Erkennungsstellen wie z.B. die vorletzten Monosaccharide in Glykan-Ketten oder Glycoproteinen und die Antigen-Strukturen von Zell-Membranen blockieren, und damit die entsprechenden Zellen vor dem Zugriff des sie umgebenden Immunsystems schützen.^[37] Beispielsweise werden Erythrozyten, Lymphozyten und Thrombozyten nach Desialylierung durch Sialidase (einem Enzym, das die spezifische Hydrolyse der glycosidischen Bindung von Sialinsäuren bewirkt) innerhalb weniger Stunden von Makrophagen oder Hepatozyten über das Galactose-spezifische Lectin gebunden und vernichtet.^[38] Bei der Regulation der natürlichen Lebensspanne von Zellen und auch bei vielen anderen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie z.B. der programmierten Apoptose, der Ausbreitung von Pathogenen oder der Metastasierung von Krebszellen, spielt

der Sialylierungsgrad der Zelloberfläche eine wichtige Rolle. Ein weiteres Beispiel ist das 9-acetylierte Disialo-Gangliosid GD3 (9-OAc-GD3; Abb. 4), ein wichtiger Regulator und Biomarker, der an der Signal-Transduktion, der Regulation von neuronalem Zell-Wachstum sowie der Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt ist, bzw. auch einen Tumor- und Entzündungsmarker darstellt.^[38] Die Polysialinsäure (PSA) ist ein Zelloberflächen-Glykan mit einem enormen hydratisierten Volumen, das hauptsächlich bei der Entwicklung von neuronalem Gewebe und Krebszellen eine Rolle spielt.^[38] PSA hat keine stabile Vorzugskonformation, und ihre Hauptfunktion ist die Blockierung von Erkennungsstellen.^[39] PSA besetzt einen großen Raum zwischen den Zellen und kann deswegen die Membran-Membran-Apposition regulieren und die Zell-Kontakte bzw. die Funktion des neuronalen Zellaggregationsfaktors (*neuronal cell-aggregation molecule*, NCAM) blockieren.

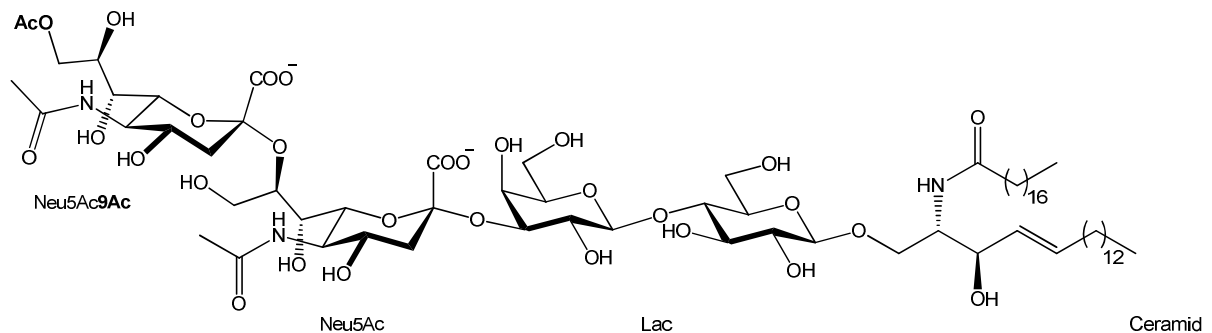


Abb. 4: Die Struktur von 9-acetyliertem Disialo-Gangliosid GD3.

Auch als spezifische biologische Erkennungsstellen sind Sialinsäuren Liganden für vielfältige Rezeptoren, wie z.B. Hormone, Toxine, Lectine und Antikörper, oder auch für anorganische Kationen bei Säugetier-Zellen, Protozoen, Bakterien, Mycoplasmen und Viren.^[10, 38, 40] Deswegen sind Sialinsäuren an vielen wichtigen zellularen und molekularen Wechselwirkungen in physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Die Eigenschaften, besonders die Ligandenfunktion, von Sialinsäuren können durch chemische Modifikationen stark beeinflusst werden. Beispielsweise kann die 9-O-Acetylierung oder N-Acetyl-Hydroxylierung von Neu5Ac neue Rezeptor-Funktionen erzeugen oder die Bindungsaffinität reduzieren. In Säugetieren, Pflanzen und Mikroorganismen wurden verschiedene Sialinsäure-bindende Lectine, nämlich Sialoadhäsionslectin (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), Myelin-assoziiertes Glycoprotein (MAG; Siglec-4), Siglec-15 und neun menschliche bzw. fünf Maus-CD33-ähnliche (CD33-r) Siglecs, identifiziert.^[41, 42] Siglecs sind Typ I

Transmembran-Proteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und aus Immun- und Blutbildungssystemen von Primaten und Nagetieren oder in bestimmten Nervensystemen entstehen. Sie binden normalerweise die terminalen Sialinsäuren von Oligosacchariden auf der Zelloberfläche und können die Zell-Zell Interaktionen und die Signalisierung durch cis- und trans-Interaktionen mit Sialinsäuren-gekoppelten Glykanen innerhalb der Zellmembran oder zwischen Zellen fördern, und damit das Immunsystem modulieren. O-Acetylierung kann die Ligand-Funktion von Sialinsäuren bei Siglec-1, -2 und -4 (MAG) blockieren.^[41] So kann der O-Acetylierungsgrad Kapselpolysaccharide der Bakterien *Streptococcus* Gruppe B die Wechselwirkung zwischen den Bakterien und Leukozyten-CD33-r-Siglec beeinflussen.^[42] Beispielsweise ist CD22 ein inhibitorischer Rezeptor von B-Zellen (Antikörper erzeugende Zellen) und reguliert vielfache B-Zell-Funktionen. Durch hydrophobe Gruppen modifizierte Sialinsäuren können als CD22-spezifische Inhibitoren betrachtet und in der Zukunft für die Modulation von B-Zell-Funktionen und die Abschwächung von Infektionen verwendet werden.^[43]

1.2. Synthese von Sialokonjugaten

Wie erwähnt gibt es mehr als 50 strukturelle Sialinsäuren-Modifikationen in der Natur. Durch verschiedene Substitutionen von Neuraminsäure-Resten werden die Eigenschaften von Sialinsäuren stark beeinflusst.^[38] Die unterschiedlichen natürlichen und nicht-natürlichen Sialinsäure-Modifikationen helfen uns, die vielfältigen biologischen Funktionen von Sialokonjugaten zu verstehen und neue Therapieansätze zu entwickeln. Wegen der Heterogenität der auftretenden Strukturen und der geringen biologischen Konzentrationen ist es sehr schwer, reine Sialoside oder Sialylglykokonjugate, besonders die natürlichen Sialinsäure-Modifikationen, aus natürlichen Quellen zu isolieren,^[44] weshalb diese in der Regel chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden müssen.

Zurzeit konzentriert sich die chemische Synthesestrategie von Sialosiden auf Neu5Ac-Donorsubstrate, die die Reaktivität und α -Stereoselektivität während der chemischen Sialylierung verbessern, zur Herstellung von Neu5Ac-enthaltenden Strukturen, wobei vorzugsweise verschiedene *N*-Schutzgruppen wie z.B. *N,N*-Diacetyl (NAc₂), *N*-Trifluoroacetyl (NHTFA), *N*-Trichloroethoxycarbonyl (NHTroc), 5-*N*-Phthalimido (NPhth) usw. geeignet scheinen.^[45] Nach der chemischen Sialylierung können die *N*-Schutzgruppen grundsätzlich entfernt und die weiteren funktionellen Gruppen durch Kupplung der erhaltenden freien Amino-Gruppe mit verschiedenen Acyl-Gruppen eingebracht werden, um weitere natürliche und nicht-natürliche Sialinsäure-Formen zu erhalten. Jedoch können derartige Methoden nur für die Synthese von Neu5Ac-enthaltende Sialoside, aber nicht für die Synthese von Sialosiden mit anderen Sialinsäure-Formen wie z.B. Neu5Gc verwendet werden. Der Grund dafür ist, dass Acyl-Gruppen, die meist für den Schutz der C7/8-OH-Gruppen von Neu5Gc verwendet werden, unter basischen und sogar sauren Bedingungen leicht die ungeschützte C5-NH-Gruppe angreifen.^[46] Prinzipiell ist die Steuerung der Stereoselektivität der Glycosidbildung dadurch erschwert, dass an C-3 kein nachbargruppenaktiver Substituent vorhanden ist. Eine erfolgreiche chemische Synthese von Neu5Gc-enthaltenden Sialosiden wurde jedoch unter Verwendung von 5*N*-Acetyl-5*N*,4*O*-oxazolidinon geschütztem Thiosialosid (**A**; Abb. 5)^[47] als Donor oder von Phosphit-Sialosid mit Acetyl- oder Benzyl-geschützter *N*-Glycolyl-OH-Gruppe als Donorsubstrat (**B/C**; Abb. 5)^[48] für die chemische α -selektive Sialylierung erreicht. Trotzdem sind diese chemische Methoden für die Synthese von Sialosiden zeitaufwändig, verlaufen nur mit begrenzter Ausbeute und Stereoselektivität und sind daher nicht hinreichend praktikabel für Untersuchungen der biologischen Funktion von Sialosiden mittels der neu entwickelten Glykan-Microarray-Technologie.^[49-51] Diese moderne

Analysenmethode kann beispielsweise für die schnelle Bestimmung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Kohlenhydraten sowie die Glycoenzym-Spezifitäten benutzt werden.

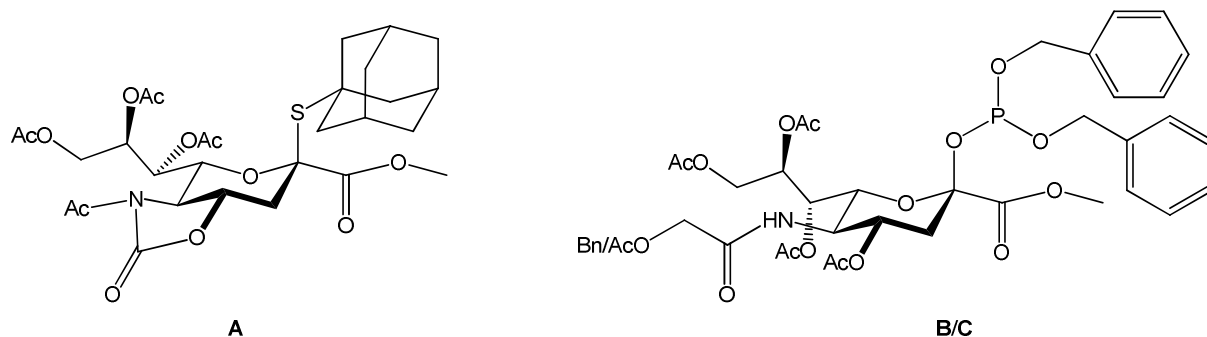


Abb. 5: Donorsubstrate^[47, 48] für chemische Sialylierungsverfahren.

Während die chemische Sialylierung oftmals umständlich und unergiebig ist, weil sie langwierige Schutz-/Entschützungs-schritte sowie aufwändige und verlustreiche Isolierung des gewünschten Produktes aus seinen Isomeren erfordert, ist die enzymatische Synthese als eine alternative Methode für die Herstellung von Sialosiden hoch effizient mit exzellenter Regio- und Stereoselektivität. Durch Kombination der Flexibilität von chemischen Methoden mit der hohen Effizienz von enzymatischen Methoden können Sialoside mit verschiedenen komplexen Struktur-Varianten, wie z.B. die Sialokonjugate Sialyl-Lewis-Analoga^[52-54] und GM3-Ganglioside^[55] chemoenzymatisch synthetisiert werden. Für die enzymatische Synthese von Sialokonjugaten werden drei enzymatische Schritte (Abb. 6) benötigt: (1) Die Synthese von Sialinsäuren durch Katalyse der Pyruvat-abhängigen *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA) oder der Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängigen *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase (NeuS); (2) die Aktivierung der hergestellten Sialinsäuren mit Hilfe der CMP-Sialat-Synthetase (CSS) unter Verbrauch von CTP; (3) der Sialyltransfer der aktivierten Sialinsäuren auf einen Glycoakzeptor durch eine Sialyltransferase (SiaT). Eine detaillierte Beschreibung dieser wichtigen enzymatischen Schritte wird in den folgenden drei Unterkapiteln gegeben.

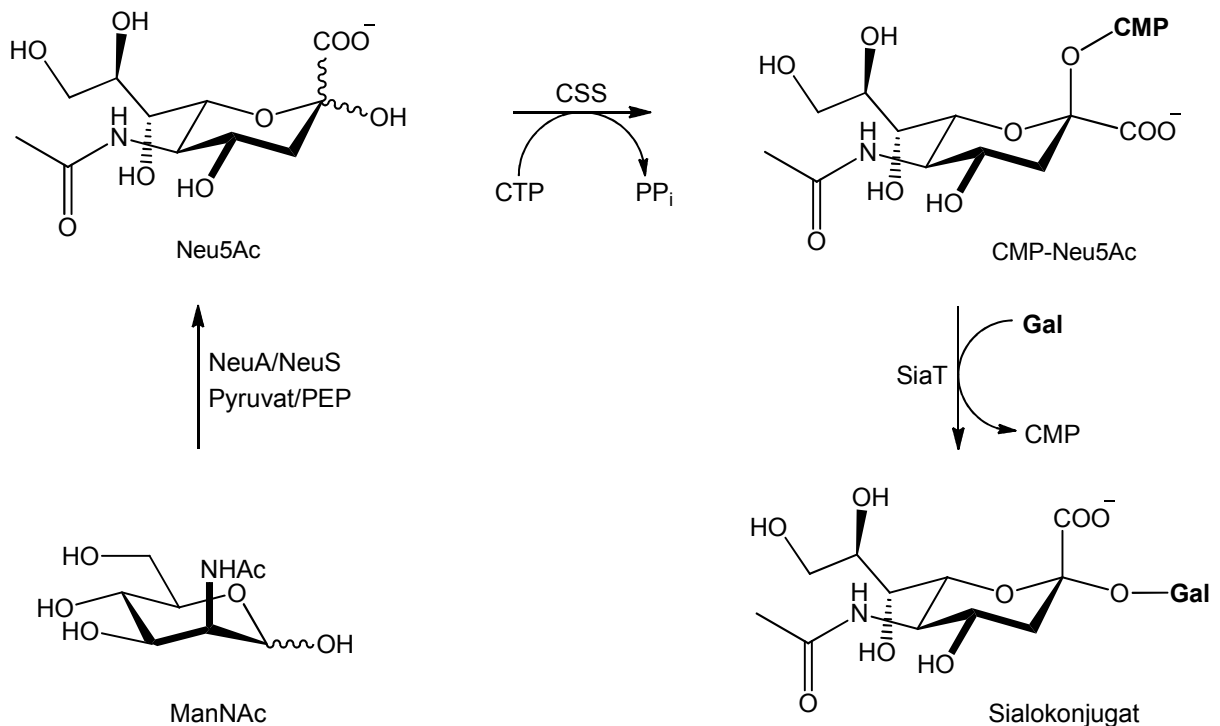


Abb. 6: Enzymatischer Syntheseweg zu Sialokonjugaten.

1.2.1. Enzymatische Synthese von Sialinsäuren

Sialinsäuren werden in Säugerzellen aus UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) über 4 spezifische Schritte mit Hilfe der Enzyme, UDP-GlcNAc-2-Epimerase, *N*-Acetylmannosamin-Kinase (ManNAc-Kinase), 9-Phospho-*N*-Acetylneuraminsäure-Synthase (Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase) sowie einer spezifischen Phosphatase biologisch hergestellt (Abb. 7).^[56, 57] Nach der Hydrolyse von UDP-GlcNAc mittels UDP-GlcNAc-2-Epimerase wird das entstehende *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) unter Verbrauch von ATP an der O6-Position durch eine ManNAc-Kinase phosphoryliert, das anschließend mittels der Neu5Ac-9-Phosphatsynthase und Phosphoenolpyruvat (PEP) zum 9-Phosphat der *N*-Acetylneuraminsäure unter Freisetzung von anorganischem Phosphat umgesetzt wird. Im abschließenden Schritt katalysiert eine spezifische Phosphatase die Dephosphorylierung zur freien *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). In Bakterien erfolgt die Biosynthese von Neu5Ac über nur zwei Schritte aus UDP-GlcNAc, wobei die Phosphorylierung entfällt. Durch UDP-GlcNAc-2-Epimerase wird UDP-GlcNAc zu UDP und ManNAc hydrolysiert, worauf die *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase (NeuS, EC 4.1.3.19) ManNAc und PEP zu Neu5Ac kondensiert.^[58-60]

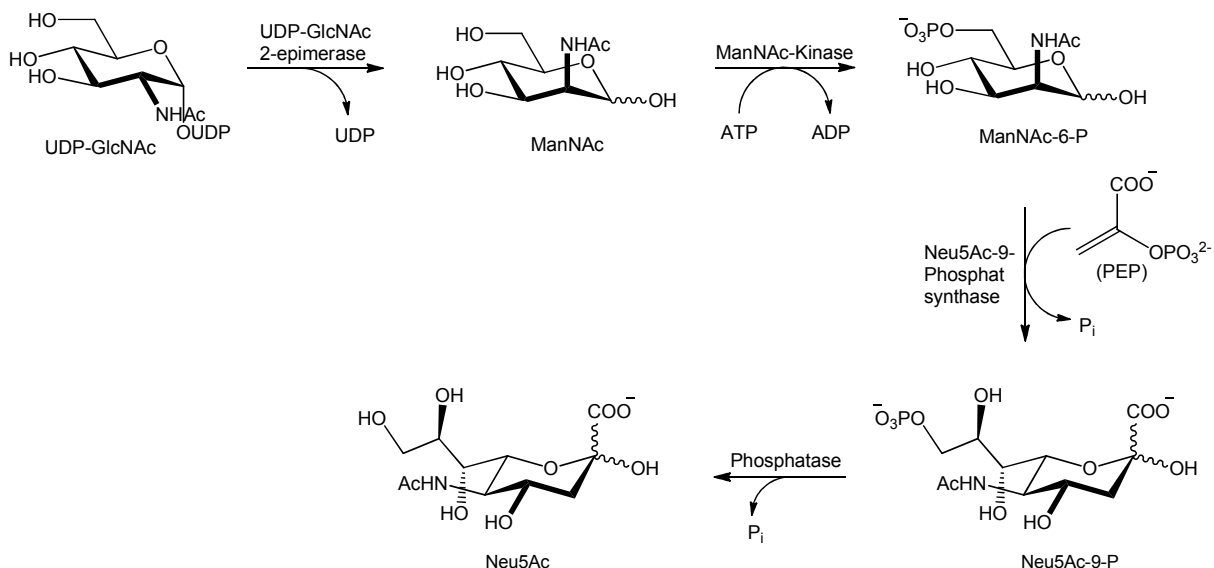


Abb. 7: Biosynthese von Neu5Ac in Säugetieren.

Für die enzymatische Synthese von Sialinsäuren aus entsprechenden Mannose- oder ManNAc-Vorstufen kommen zwei Enzymtypen in Frage, nämlich die *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA, EC 4.1.3.3) und die *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase (NeuS, EC 4.1.3.19). Der primäre Unterschied zwischen den beiden Enzymtypen sind die zwei unterschiedlichen, an den Katalysereaktionen beteiligten nucleophilen Komponenten, Na-Pyruvat bzw. Phosphoenolpyruvat (PEP). Die NeuS kommt im Sialinsäurestoffwechsel der humanpathogenen Bakterien *Neisseria meningitidis*,^[61, 62] *E. coli* K1,^[63] *Campylobacter jejuni*^[64] oder *Streptococcus agalactiae*^[65] vor und katalysiert unter Verbrauch von Phosphoenolpyruvat (PEP) als Nucleophil und Freisetzung von anorganischem Phosphat die irreversible Bildung der Sialinsäure. Für die NeuS-katalysierten Reaktionen werden zweiwertige Metalle, wie z.B. Ca^{2+} ,^[66] Co^{2+} oder Mn^{2+} , als Kofaktor für die Enzymaktivität benötigt. Welches Metallion verwendet werden soll, ist abhängig von der Enzymquelle. Beispielsweise wird NeuS aus *Streptococcus agalactiae* durch Co^{2+} gut aktiviert,^[65] während Mn^{2+} ein wichtiger Metall-Kofaktor für NeuS aus *Neisseria meningitidis*^[61, 62, 64] ist und auch die Enzymaktivität von NeuA aus *Campylobacter jejuni* stimulieren kann.^[64] Liu et al.^[67] haben gezeigt, dass Mn^{2+} als elektrostatischer Katalysator die Aldehyd-Gruppe von ManNAc aktiviert, so dass der C3-Alken-Kohlenstoff von PEP leicht das Aldehyd-C1-Atom angreifen kann, um ein Oxocarbeniumion als Übergangsstruktur zu bilden. Mn^{2+} unterstützt die Bildung einer nucleophilen OH-Gruppe aus einem aktivierten Wassermolekül, das die *si*-Seite der Oxocarbeniumion-Übergangsstruktur nucleophil angreift und dabei eine tetraedrische Zwischenstruktur mit

einer (2R)-Konfiguration bildet. Mit Freisetzung von anorganischem Phosphat resultiert Neu5Ac als Endprodukt (Abb. 8).

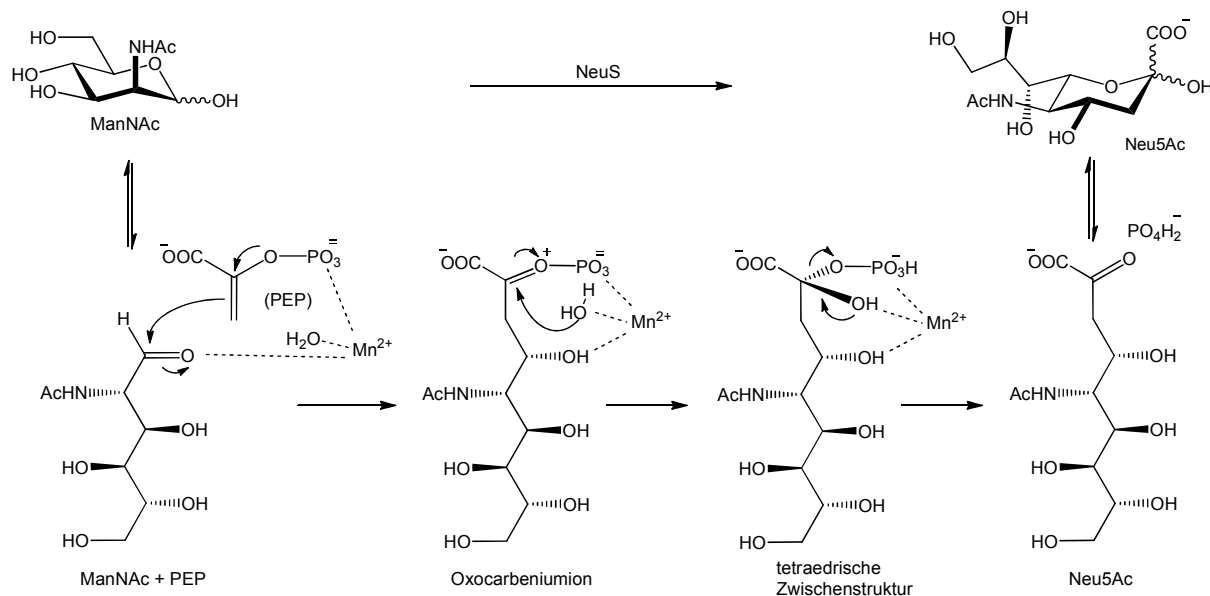


Abb. 8: Mechanismus der *Neisseria meningitidis* NeuS katalysierten Neu5Ac-Bildung nach Liu. et al.^[67]

Die N-Acetylneuraminsäure-Synthase (NeuS) aus *Neisseria meningitidis* Serogruppe B konnte erstmals in unserem Arbeitskreis von Frau Dr. Knorst in größerem Maßstab in *E. coli* mit Hilfe eines effektiven Überexpressionssystems hergestellt werden^[68] und wurde in den Arbeiten von M. Knorst und P. Unruh für präparative Zwecke verwendet.^[68, 69]

Für die präparative enzymatische Synthese von Neu5Ac und seinen Analoga, sowie von Sialinsäuren aus unterschiedlichen Pentosen und deren Derivaten als Akzeptor-Substraten, wird jedoch meist die N-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA) verwendet.^[70, 71] Die NeuA wird in Säugern und in bestimmten pathogenen oder nicht-pathogenen Bakterien gefunden,^[72] wobei sie die interzelluläre Sialinsäure-Konzentration in Säugezellen und in *E. coli* K12 reguliert.^[10, 73, 74] Bei der quantitativen Bestimmung von Sialinsäuren in Glycoproteinen, Glycolipiden oder Polysialinsäuren auf Zelloberflächen wird sie zusammen mit einer Sialidase angewendet.^[75] Das Gen der NeuA wurde aus *E. coli*,^[76-78] *Clostridium perfringens* A99,^[74] *Haemophilus influenza*,^[79] *Trichomonas vaginalis*^[80] und *Pasteurella multocida*^[81] kloniert. Die NeuA aus *E. coli* K-12 wurde in Kombination mit mehreren anderen Enzymen für die Ein-Topf-Synthese von verschiedenen Sialinsäuren, Sialosiden und deren Analogen sowie von

Sialinsäuren enthaltenden Disacchariden verwendet.^[78, 82, 83] Im Prinzip katalysiert die NeuA die reversible Aldol-Spaltung von Neu5Ac zu Pyruvat und ManNAc (Abb. 9).^[84] Na-Pyruvat als Standard-Donorsubstrat^[85] kann im Überschuss in den NeuA-Reaktionen eingesetzt werden, um das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der Sialinsäure-Seite zu verschieben. Als Akzeptorbausteine können nicht nur Zucker mit normaler D-Konfiguration, sondern auch mit L-Konfiguration wie z.B. L-Gulose, L-Mannose, modifizierte L-Mannose usw. von der NeuA akzeptiert werden, worauf die produzierten Sialinsäuren eine äquatoriale Gruppe an der C4-Position haben.^[86]

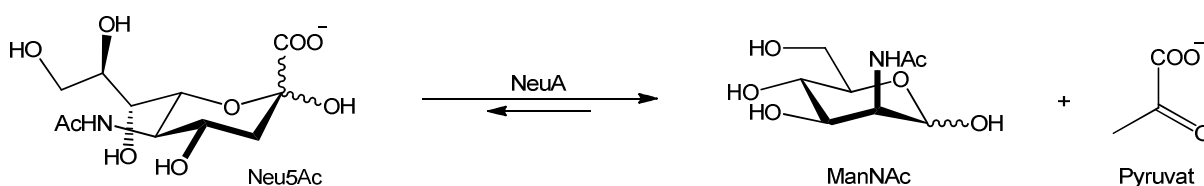


Abb. 9: NeuA-katalysierte reversible Spaltung von Neu5Ac.

1.2.2. Enzymatische CMP-Aktivierung von Sialinsäuren

Die enzymatische Nucleotid-Aktivierung einer Sialinsäure ist der entscheidende Schritt für ihre enzymatische Übertragung als Donorsubstrat auf einen Akzeptor durch Katalyse einer Sialyltransferase. Die Nucleotid-Aktivierung wird durch eine CMP-Sialat-Synthetase (CSS; EC 2.7.7.43) katalysiert, die den nucleophilen Angriff von der β -anomeren C2-OH-Gruppe der Neu5Ac auf das α -Phosphat des Cytidintriphosphats (CTP) mit Hilfe des wichtigen Kofaktors Mg^{2+}/Mn^{2+} zur Bildung der Cytidin-5'-monophosphor-N-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) hauptsächlich in der β -Konfiguration erlaubt (Abb. 10).^[87-90] Anorganisches Pyrophosphat (PP_i) als Nebenprodukt ist ein Inhibitor für die Aktivierung^[68, 89] und kann bei präparativer Nutzung durch eine anorganische Pyrophosphatase (PP_{ase}) zu Phosphat hydrolysiert werden. Da letzteres als schwerlösliches Magnesium-Ammonium-Salz ausfällt und so aus der Reaktion entfernt wird, ist damit auch ein höherer Reaktionsumsatz gewährleistet.

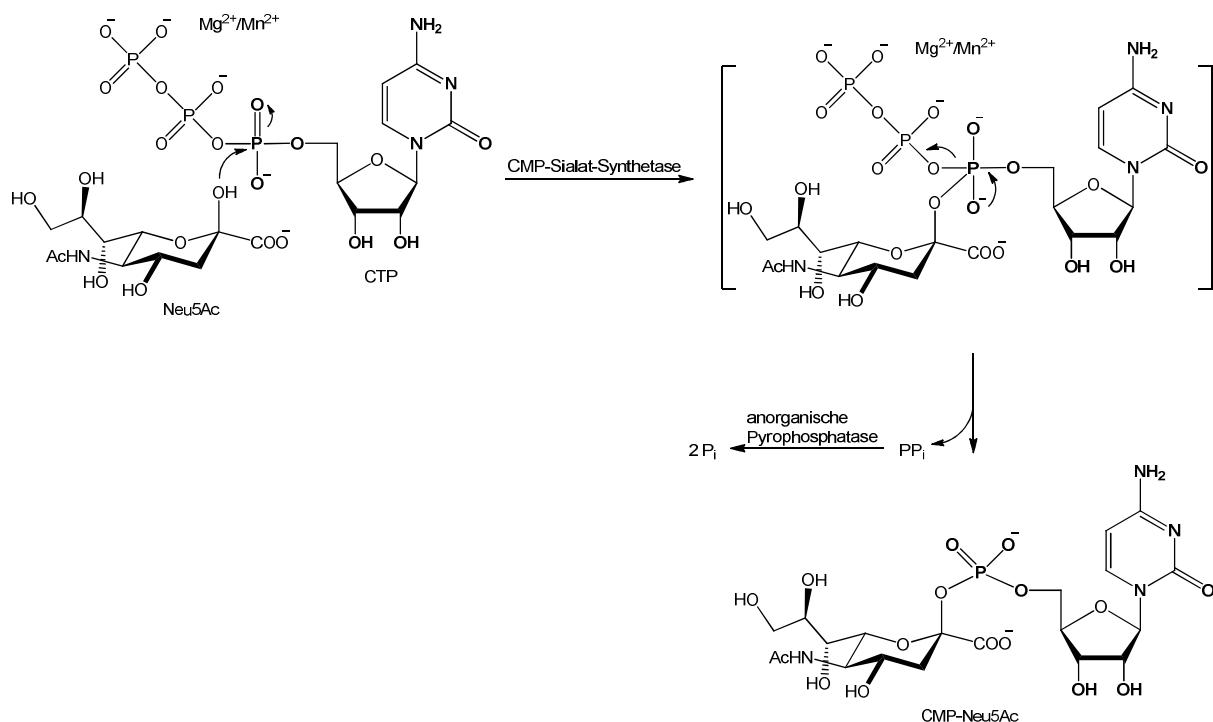


Abb. 10: Enzymatische Nucleotid-Aktivierung von Neu5Ac.

Die CMP-Sialat-Synthetase (CSS; auch *N*-Acylneuraminat-Cytidyltransferase, CMP-Sialat-Pyrophosphorylase oder Acylneuraminat-Cytidyltransferase genannt) wurde schon aus verschiedenen eukaryotischen und prokaryotischen Quellen isoliert. Aus verschiedenen Säugetiergeweben aufgereinigte CSS ist wenig stabil und bietet eine niedrige spezifische Aktivität (ca. 0.2 U/mg), so dass ihre Anwendung für die präparative Synthese stark beschränkt ist.^[91-93] Die CSS aus Wirbeltieren war kürzlich Gegenstand eines Reviews von Münster-Kühnel *et al.*^[94] Bakterielle CSS wurde hauptsächlich aus menschlichen pathogenen Bakterien, wie z.B. aus *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococci* Gruppe B, *Haemophilus ducreyi* und *Pasteurella hemolytica* erhalten.^[95] Davon ist die CSS aus *Neisseria meningitidis* die erste aufgereinigte und gut charakterisierte bakterielle CSS.^[87] In letzter Zeit wurde auch eine thermostabile CSS aus einem anaeroben gramnegativen Bakterium (*Clostridium thermocellum*) kloniert und in *E. coli* exprimiert, die optimale Aktivität bei 50 °C und pH 9.5 zeigt und Mn^{2+} als Kofaktor benötigt.^[96] Diese Entdeckung bestätigt, dass der Sialinsäure-Stoffwechselweg auch in nicht-pathogenen Organismen existent ist. Auch konnte eine neue CSS aus einer Meeres-Bakterie (*Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145) isoliert werden,^[97] die eine optimale Aktivität bei 35 °C und pH 9 hat. Wie andere CSS aus pathogenen Bakterien benötigt sie Mg^{2+} als Kofaktor. Ähnlich wie die CSS aus *Haemophilus ducreyi* akzeptiert sie nicht nur die natürliche Neu5Ac sondern auch Neu5Gc (*N*-Glycolylneuraminsäure) als Enzymsubstrat.

Die Eigenschaften der verschiedenen bisher bekannten bakteriellen CSS sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Quelle und Eigenschaften von CMP-Sialat-Synthetasen

Enzym-Quelle (MW, g/mol)	optimale T (°C)	optimaler pH	Kofaktor	K _M (mM)	
				CTP	Neu5Ac
<i>E. coli</i> (49,000) ^[98]	37	9.0	Mg ²⁺	0.31	4
<i>N. meningitidis</i> (24,800) ^[87]	37	8.5	Mg ²⁺	0.31	0.34
<i>Streptococci</i> Gruppe B (45,500) ^[99]	25-37	8.3-9.4	Mg ²⁺	1.4	7.6
<i>H. ducreyi</i> (25,400) ^[100]	37	8-9.5	Mg ²⁺	0.04	0.26
<i>P. hemolytica</i> (43,000) ^[101]	37	9.0	Mg ²⁺	1.77	1.82
<i>C. thermocellum</i> (26,000) ^[96]	50	9.5	Mn ²⁺	0.24	0.13
<i>P. leiognathi</i> JT-SHIZ-145 (55,800) ^[97]	35	9.0	Mg ²⁺	1.57	0.87

MW: Molekularmasse der CSS.

Im Vergleich zur CSS aus *E. coli* K1 und *Streptococci* Gruppe B zeigte die CSS aus *Neisseria meningitidis* bisher das höchste Expressionsniveau, die höchste Substrat-Flexibilität und die höchste Katalyseeffizienz, und wurde zur präparativen Aktivierung von Neu5Ac und verschiedener Derivate mit C5-, C8- oder C9-Modifikationen verwendet.^[78] Ein Fusions-Protein mit CSS- und α 2,3-Sialyltransferase-Aktivität wurde von *Gilbert et al.* aus Genen von *Neisseria meningitidis* konstruiert und in *E. coli* für die präparative Herstellung von Oligosacchariden genutzt.^[102] Ein Vorteil ist, dass dieses Fusions-Protein auch verzweigte Oligosaccharide als Akzeptor akzeptiert. Bislang wurde die CSS aus *Neisseria meningitidis* in Kombination mit verschiedenen Sialyltransferasen breit für die präparative Synthese von verschiedensten komplexen Sialokonjugaten verwendet, wie z.B. die Synthese von 9-O-acetylierten α 2,3-verknüpften Sialosiden.^[103] Für die CSS aus *Neisseria meningitidis* ist CTP das Standard-Substrat für die Aktivierung, das nicht durch ATP, UTP oder GTP ersetzt werden kann,^[87] im Unterschied zur CSS aus *P. hemolytica*, die daneben auch CDP, UTP, UDP und TTP als Enzymsubstrat akzeptiert.^[101] Im Arbeitskreis wurde eine rekombinierte CSS aus *Neisseria meningitidis* Serogruppe B mit Hilfe eines hoch effektiven Überexpressionssystems in *E. coli* produziert und für die präparative Aktivierung von verschiedenen modifizierten Neu5Ac-Derivaten (z.B. mit variierten N-Acyl-Gruppen) und –Analogen (z.B. KDN, 4,6-bis-epi-

KDO) verwendet,^[68, 69, 104] was ihre breite Substrattoleranz dokumentiert. Bislang wurden die Protein-Kristallstrukturen der strukturell und funktionell verwandten CMP-KDO-Synthetase aus *E. coli*,^[105, 106] Maus-CSS (tetramere Struktur)^[107] und *Neisseria meningitidis* CSS (Dimer)^[108] publiziert, die helfen, den Katalyse-Mechanismus bzw. den Unterschied zwischen bakterieller CSS und Wirbeltier-CSS zu verstehen. Jedoch sind noch mehr strukturelle Informationen verschiedener CSS und weitere strukturelle Veränderungen der Enzyme nötig, um die Substrattoleranz des Enzyms weiter verbreitern und die biokatalytischen Eigenschaften für Synthesen verbessern zu können.

1.2.3. Enzymatischer Sialyltransfer

Der dritte Schritt für die enzymatische Synthese von Sialokonjugaten ist die Übertragung einer Sialinsäure aus der CMP-aktivierten Form auf eine geeignete Sialyl-Akzeptorverbindung mittels einer Sialyltransferase (SiaT; EC. 2.4.99.n) (Abb. 11). Das bei der Reaktion entstehende CMP inhibiert den enzymatischen Sialyltransfer,^[109] kann aber durch eine Phosphatase zu Cytidin und Phosphat hydrolysiert werden, um den präparativen Sialyltransfer effektiv zu beschleunigen. Alternativ kann CMP über einen Nucleotid-Regenerierungszyklus mittels Nucleosidmonophosphatkinase/Myokinase und Pyruvatkinase zurück zu CTP umgesetzt werden, mit dem Sialinsäuren durch die CSS in situ kontinuierlich CMP-aktiviert und auf die Akzeptorverbindung übertragen werden.^[110]

Sialyltransferasen katalysieren den Transfer mit Regio- und Stereo-Spezifität.^[111] Abhängig vom speziellen Typ der Sialyltransferase kann eine Sialinsäure so auf terminale Galactose-, *N*-Acetylgalactosamin-, *N*-Acetylglucosamin- oder sogar Sialinsäure-Einheiten α -konfigurationsselektiv mit einer 2,3-, 2,6- oder 2,8-Verknüpfung zu den entsprechenden Sialooligosacchariden übertragen werden.

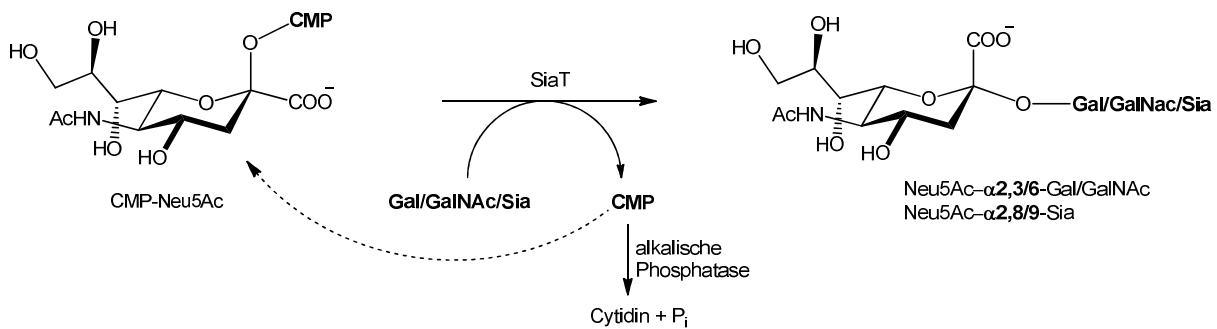


Abb. 11: Enzymatischer Sialyltransfer; Unterdrückung der CMP-bedingten SiaT-Inhibition durch Zusatz von alkalischer Phosphatase oder über einen Nucleotid-Regenerierungszyklus.

Bislang wurden viele Sialyltransferasen aus Säugern, niederen Wirbeltieren, Bakterien und Viren untersucht.^[112-114] Ein aktueller umfassender Review und eine Analyse der verschiedenen Sialyltransferasen aus Wirbeltieren wurde kürzlich von *Harduin-Lepers* publiziert.^[115] Meist sind bakterielle Sialyltransferasen stabiler, über Expression in *E. coli* besser produzierbar und haben eine breitere Substrat-Spezifität als die von Säugern abgeleiteten Enzyme.^[112, 116] Entsprechend der synthetisierten Kohlenhydrat-Verknüpfung werden Sialyltransferasen in 4 Typen eingeteilt: Galactosid $\alpha 2,3$ -SiaT (ST3Gal), Galactosid $\alpha 2,6$ -SiaT (ST6Gal), GalNAc $\alpha 2,6$ -SiaT (ST6GalNAc) sowie $\alpha 2,8$ -Sia (ST8Sia). Auf der Grundlage von Sequenzähnlichkeiten in der Datenbank kohlenhydrataktiver Enzyme werden alle SiaT in fünf Familien eingeteilt:^[117] verschiedene SiaT aus Eukaryoten und Viren gehören zu der Glycosyltransferase-Familie (GT) 29, während alle bakteriellen SiaT zu den Familien GT 38, GT 42, GT 52 und GT 80 gehören.^[118] Bis jetzt wurden mehr als 20 SiaT aus verschiedenen Bakterien kloniert,^[118] wie z.B. die $\alpha 2,8/9$ -Polysialyltransferasen aus *E. coli* K1/K92^[119, 120] und *N. meningitidis*^[121] (GT Familie 38), die Lipooligosaccharid- $\alpha 2,3$ -SiaT bzw. die bifunktionelle $\alpha 2,3/8$ -SiaT aus *Campylobacter jejuni*^[122] und *Haemophilus influenzae*^[123] (GT familie 42), die $\alpha 2,3$ -SiaT aus *N. gonorrhoeae*, und *N. meningitidis*^[124] (GT familie 52) sowie die $\alpha 2,6$ -SiaT bzw. die bifunktionelle $\alpha 2,3/6$ -SiaT aus *Photobacterium damsela*^[125] und *Pasteurella multocida*^[126] (GT familie 80). Die Kristallstrukturen von sieben SiaT in Gegenwart von CMP, einem Donor wie CMP-Neu5Ac und/oder einem Akzeptor wie Lactose wurden aufgeklärt, darunter 6 bakterielle SiaT wie die $\alpha 2,3/8$ -SiaT (CstII) aus *Campylobacter jejuni* OH4384,^[127] $\alpha 2,3$ -SiaT aus *Pasteurella multocida*,^[128, 129] *Campylobacter jejuni*,^[130] und *Photobacterium phosphoreum*^[131] bzw. die $\alpha 2,6$ -SiaT aus *Photobacterium sp.*^[132] sowie eine Säuger-SiaT,^[133] was einen Einblick in die Substrat-Bindungsstellen und die katalytischen Mechanismen der Enzyme erlaubt.

Mehrere SiaT wurden bisher aus Meeresbakterien kloniert und können mittels Überexpression in *E. coli* in großen Mengen produziert werden. Manche meeresbakteriellen SiaT zeigen erstaunlicher Weise nicht nur SiaT- sondern auch (Trans)Sialidase-Aktivität, wie z.B. die beiden α 2,3-SiaT aus *Photobacterium phosphoreum* JT-ISH-467 und *Photobacterium sp.* JT-ISH-224 bzw. die α 2,6-SiaT aus *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-119.^[118] Die α 2,3-SiaT aus *Photobacterium sp.* JT-ISH-224 kann eine Neu5Ac-Einheit gleichzeitig auf die C2- und die C3'-OH-Gruppe von α -Lactose (**D**; Abb. 12), auf die β -anomere OH-Gruppe von D-Mannose (**E**; Abb. 12), auf Inositol bzw. andere Kohlenhydrate transferieren, die eine Diol-Struktur aufweisen, die derjenigen der C3-/C4-Dioleinheit von Galactose entspricht (z.B. **F**; Abb. 12).^[134-136] Bei der α 2,6-SiaT aus *Photobacterium sp.* JT-ISH-224 wurde bestätigt, dass sie die Übertragung von Neu5Ac sowohl auf C6- sowie C6'-OH-Gruppe von Lactose (**G**; Abb. 13) bzw. von KDO (2-Keto-3-deoxyoctonat) auf die C6'-OH von Lactose (**H**; Abb. 13) katalysieren kann.^[137] Die α 2,6-SiaT aus *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145^[138] und *Photobacterium damsela* ohne N-terminale 112 Aminosäuren^[139] wurden kloniert und sind mittels Überexpression in *E. coli* in großen Mengen produzierbar. Im Vergleich zu allen Säugetier- und anderen Bakterien-SiaT (pH-Optimum im Sauren) zeigen sie optimale Aktivität unter basischen Bedingungen (pH 7.5-10.0), was ein großer Vorteil für die Herstellung von Sialokonjugaten ist, da die Sialyltransferase-Donorsubstrate (besonders die CMP-Konjugate mit nicht-natürlichen Sialinsäuren) nur unter basischen Bedingung stabil sind. Deswegen sind diese beiden Enzyme für die effiziente Synthese von verschiedenen neuartigen Sialinsäurehaltigen Glykokonjugaten sehr nützlich.

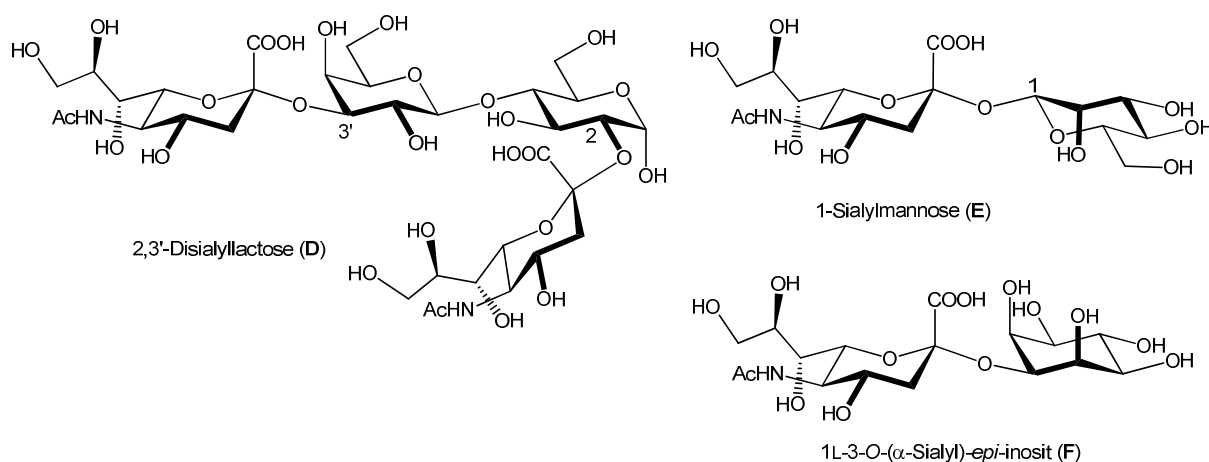


Abb. 12: Einige Strukturen, die durch die α 2,3-SiaT aus *Photobacterium sp.* JT-ISH-224 hergestellt werden können.

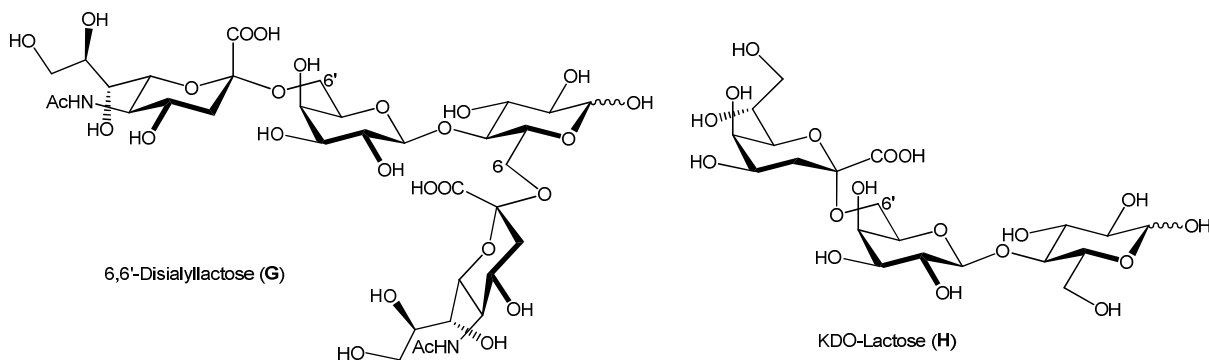


Abb. 13: Durch die α 2,6-SiaT aus *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 synthetisierbare Strukturen.

Für die präparative Synthese von Sialyloligosacchariden wurden in jüngerer Zeit verschiedene α 2,3- und α 2,6-SiaT eingesetzt, wie z.B. die beiden multifunktionellen SiaT, α 2,3-SiaT aus *Pasteurella multocida* und α 2,6-SiaT aus *Photobacterium damsela* für die Synthese verschiedener Sialoside in Eintopf-drei-Enzym-Systemen.^[82, 126, 140, 141] Die α 2,3-SiaT aus *Campylobacter jejuni* wurde vor allem für die Synthese von Ganglio-Oligosacchariden^[142] und Oligosaccharidischen Krebs-Antigenen^[143] verwendet. Kürzlich wurde publiziert, dass die sialysierten Trisaccharide 6'-Sialyllactose und 3'-Sialyllactose durch die bakterielle α 2,6-SiaT aus *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 und α 2,3-SiaT aus *N. meningitidis* mit einer colorimetrisch geschätzten Produktionskonzentration von mehr als 25 g/L produziert wurde.^[137, 144] Interessanterweise konnten mittels Ganzzellkatalyse auch die neuartige 6,6'-Disialyllactose (G; Abb. 13) und KDO-Lactose (H; Abb. 13) mit Hilfe der α 2,6-SiaT aus *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 präparativ hergestellt werden.^[137] Wegen der breiten Akzeptortoleranz der α 2,3-SiaT aus *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 konnten hiermit die nicht natürliche 2,3'-Disialyllactose (D; Abb. 12), 1-sialylierte Mannose (E; Abb. 12) sowie verschiedene Sialyl-Inosite (z.B. F; Abb. 12) präparativ synthetisiert werden.^[136]

2. Zielsetzung

Jahrzehntelange Sialinsäure-Forschung hat gezeigt, dass Sialinsäuren direkt oder indirekt in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen eine sehr wichtige Rolle spielen, wie z.B. Zell-Zell-Adhäsion, interzelluläre Kommunikation, Blutgerinnung, Entzündung, Krebs-Metastasierung und bakterielle oder virale Infektionen. Obwohl Sialinsäuren in den meisten Fällen die terminale Position von Glycoproteinen und Glycolipiden in einer Vielzahl von Organismen besetzen, wurden in jüngerer Zeit bei Kapsel- und Membran-Polysacchariden bestimmter pathogener Mikroorganismen auch interne Sialinsäure-Reste als eine Komponente sich wiederholender Oligosaccharid-Einheiten gefunden. Während derartige Polysaccharide vermutlich bedeutende Funktionen für die effiziente Bindung der pathogenen Organismen an ihren Wirtszellen haben, wären sie wegen ihrer spezifischen Natur für die Entwicklung neuartiger pharmazeutischer Ansätze zur Bekämpfung äußerst wertvoll.

Generell sind Sialylglykokonjugate in reiner Form und einheitlicher Struktur aus natürlichen Quellen extrem schwer zu isolieren. Da die chemische Sialylierung wegen des tertiären anomeren Zentrums und des Fehlens einer nachbaraktiven Gruppe in den Sialinsäuren allgemein sehr schwierig ist, kommt enzymatischen Synthesemethoden eine Schlüsselrolle zu. Daher ist die Verbesserung der Methodik des enzymatischen Sialyltransfers auf der Basis neuer, gut zugänglicher Enzyme bzw. deren neue Anwendungsperspektiven für die präparative Beschaffung neuartiger Sialokonjugate ein wichtiger Schritt.

Bisher wurden die terminalen Sialokonjugaten aus natürlicher Neu5Ac mittels aufwendiger chemischer Schritte oder mittels enzymatischer Katalyse durch CMP-Sialat-Synthetase und $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -Sialyltransferasen synthetisiert. Obwohl einzelne Arbeitsgruppen auch schon manche modifizierten Neu5Ac-Konjugate synthetisiert haben, ist dieser Substanzpool für die detaillierte Erforschung aller biologischen Funktionen von Sialinsäuren nicht ausreichend. Somit ist die Herstellung verschiedener neuartiger, nicht-natürlicher Sialokonjugate aus unterschiedlichen Neu5Ac/KDN-Derivaten und deren Analoga gefordert. Außerdem ist die Herstellung interner Sialokonjugate auch eine interessante Aufgabe, da deren Entdeckung in bestimmten pathogenen Bakterien vermutlich auch für die Pathogenität wichtige Rolle spielt.

Im Regelfall sind die hergestellten Sialoside kaum weiter veränderbar und meist nur im μg - bis mg-Maßstab herstellbar. Die präparative Synthese von verschiedenen Sialokonjugaten über den Gramm-Maßstab hinaus ist wegen des Verbrauchs an großen Enzymmengen bis jetzt noch nicht gelungen. Jedoch ist das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x eine kommerzielle Ausnahme,

da dieses als potentiell^{es} Entzündungsmedikament entwickelt wurde. Die *Bertozzi*-Arbeitsgruppe konnte reaktive Sialinsäurederivate in lebenden Zellen metabolisch herstellen. Hierbei werden die Zelloberflächen durch mit einer funktionellen Gruppe gekoppelte Sialinsäuren modifiziert und anschließend bio-orthogonal mit einem Marker, wie einem Fluoreszenzchromophor, chemisch verknüpft. Leider ist die Anzahl von so zugänglichen modifizierten Sialinsäurekonjugaten wegen der hohen Spezifität der biokatalytischen Enzyme in Zellen mit Hilfe dieser Methode stark begrenzt. Eine Alternative ist die chemoenzymatische *in vitro*-Synthese von ungewöhnlich, funktionalisierten Sialinsäuren, die mit einer funktionellen Gruppe, wie z.B. einer Azid- oder Alkin-Gruppe gekoppelt sind, oder direkt mit einem Fluoreszenzchromophor markiert werden sollen.

Ausgehend von den mit funktionellen Gruppen modifizierten Sialinsäuren könnten die verschiedenen nicht-natürlichen Sialokonjugate enzymatisch synthetisiert und anschließend mit Hilfe der funktionellen Gruppen mittels CuAAC- oder Staudinger-Reaktionen mit Chromophoren chemisch gekoppelt werden. Eine bessere und einfachere Methode für die Synthese von fluoreszenzmarkierten Sialokonjugaten wäre die enzymatische Übertragung von fluoreszenzmarkierten Sialinsäuren direkt aus deren CMP-aktivierter Form auf den Akzeptor.

Üblicherweise werden nicht-biologische Akzeptoren, wie z.B. β -Allyl,^[44] β -Propargyl,^[145] β -para-Nitrophenyl,^[140] β -Azido-^[126] oder β -Azidoalkyl-glycoside^[82, 142, 146, 147] für die Synthese von modifizierten Sialokonjugaten angewendet. Die Übertragung von Sialinsäuren auf biologische Akzeptoren, wie z.B. auf Glycoproteine oder Glycolipide in Zellmembranen, ist noch entwicklungsbedürftig. Funktionalisierte Sialinsäuren könnten dann möglicherweise für die bio-orthogonale oder enzymatische Herstellung von fluoreszenzmarkierten Zelloberflächen *in vivo* angewendet werden, womit die Visualisierung von biologischen Prozessen ermöglicht werden könnte.

Die Kombination aus einer chemoenzymatischen *in vitro* Synthese von modifizierten Sialinsäuren und der enzymatischen Übertragung der Sialinsäuren auf biologische Akzeptoren *in vivo* ist eine interessante methodische Perspektive für die Herstellung von mit funktionellen Sialinsäuren modifizierten lebenden Zellen.

In der Natur gibt es verschiedene spezielle Enzyme für die *in vivo*-Modifizierung von natürlich synthetisierten Neu5Ac-Konjugaten. *In vitro* wäre es vorteilhaft, zuerst die modifizierten Sialinsäuren chemoenzymatisch zu synthetisieren, worauf diese dann idealerweise über einen allgemeinen Zugang enzymatisch aktiviert und konjugiert würden. Dieser Syntheseweg erfordert jedoch verfügbare Enzyme für Aktivierung und Sialyltransfer (CSS, SiaT) mit sehr

breiter Substrattoleranz. Für die CSS gab es zwar viele synthetische Einzel-Anwendungsbeispiele, aber noch keine systematischen kinetischen Untersuchungen. Um die Substrattoleranz und die Bindungsaffinität der CSS schnell und effizient zu quantifizieren, ist die Entwicklung einer neuen, einfachen, kontinuierlichen Assaymethode hoch interessant. Für die Sialyltransferase müsste darüber hinaus auch ihre Flexibilität bezogen auf Donoren (CMP-Konjugate) und Akzeptoren systematisch studiert werden. Auf Basis solcher systematischer Studien für CSS und SiaT könnten wir dann die enzymatischen Synthesen unterschiedlicher neuartiger Sialokonjugate optimieren.

Bis jetzt wurden immer einheitliche Sialooligosaccharide mit terminalen Sialinsäure-Einheiten hergestellt. Die Synthese von repetitiven Strukturen mit internen Sialinsäureeinheiten ist wegen ihrer biologischen Funktion in pathogenen Prozessen interessant. Deswegen wird eine effiziente Synthesemethode dafür benötigt. Eine mögliche oder gewünschte Synthesestrategie für die Bildung der Sialooligosaccharide bzw. Sialopolysaccharide mit sich wiederholenden Sialoglycosideinheiten wäre der Sialyltransfer von mit einem Sialyltransferase-Akzeptor gekoppelten CMP-Sialinsäuren, die nicht nur als Sialylakzeptor, sondern auch als Sialyldonor betrachtet werden können (Abb. 14).

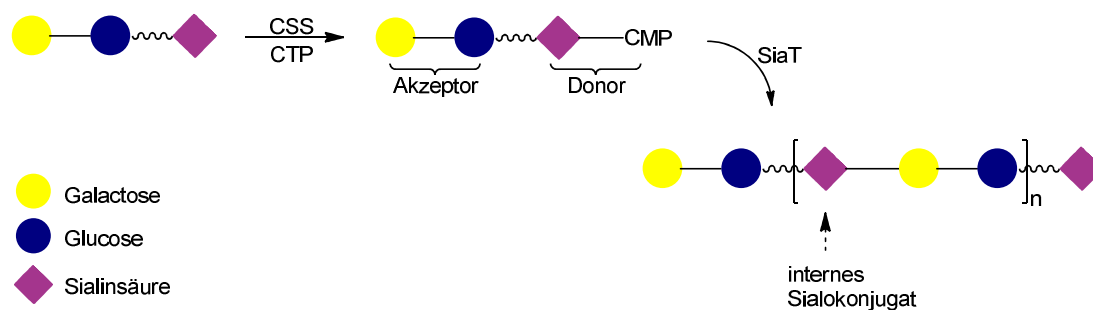


Abb. 14: Synthesestrategie der enzymatischen Blockpolymerisation

Methodische Entwicklungen in die verschiedenen gesamten Richtungen waren Gegenstand der experimentellen Studien zu dieser Arbeit.

3. Allgemeiner Teil

3.1. Chemoenzymatische Synthese von funktionellen Sialinsäuren

3.1.1. Chemische Synthese von Aldolase-Substraten

Sialinsäuren als wichtige Kohlenhydrat-Komponenten von Glycoproteinen und Glycolipiden in Zellmembranen spielen bei vielen biologischen Prozessen, wie z.B. Zell-Zell-Erkennung, entzündliches und immunologisches Geschehen, Krebs-Metastasierung und Virusinfektionen eine bedeutende Rolle.^[38, 148, 149] Neu5Ac ist die in der Natur am häufigsten vorkommende Sialinsäure, die in Säugern und Bakterien aus ManNAc biologisch synthetisiert wird.^[8] In den zwei Arbeitskreisen von *Bertozzi* und *Reutter* wurden mit der Methode des *metabolic oligosaccharide engineering* auch modifizierte D-Mannosaminderivate neben den natürlichen Vorläufern von lebenden Zellen aufgenommen und über den Biosyntheseweg des natürlichen Substrats sowohl *in vitro* als auch *in vivo* effizient zu modifizierten Sialinsäurekonjugaten auf der Zelloberfläche metabolisiert.^[150-156] Dadurch konnten in Abhängigkeit vom Zelltyp 10-85% der natürlichen Sialinsäuren an Zelloberflächen durch modifizierte Sialinsäuren ausgetauscht werden. Ein Studium von unterschiedlichen, mit nicht-natürlichen Sialinsäuren modifizierten Zelloberflächen kann einen wertvollen Beitrag dazu leisten, die Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen auf molekularem Niveau zu verstehen. Andererseits sind nicht-natürliche ManNAc-Analoga mit langen und verzweigten *N*-Acyl-Resten schlechte Substrate für die biosynthetischen Enzyme.^[150, 157] Im Labor wird daher für die enzymatische Synthese von Sialinsäuren meist die kommerziell verfügbare *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA) wegen derer guten Substrattoleranz bevorzugt.

Für die verschiedenen Aspekte der geplanten Untersuchungen sollten daher die verschiedenen Sialinsäurederivate mittels NeuA-Katalyse enzymatisch erhalten werden, wobei zuerst die meist sterisch anspruchsvoll substituierten Mannosamin- und Mannose-Derivate hergestellt werden mussten. Für die Synthese von *N*-Acyl-Mannosamin-Derivaten durch Acylierung von kommerziellen D-Mannosamin (ManNH₂) müssen die entsprechenden Carbonsäuren zuerst mittels einer geeigneten Kupplungsmethode^[158] aktiviert werden. Dabei wird die Carboxylgruppe für die Amid-Kupplung zunächst durch Einführung eines elektronenziehenden Substituenten, wie z.B. mit DIC (Diisopropylcarbodiimid) oder DCC (Dicyclohexylcarbodiimid), zu einem reaktiven Acylharnstoff umgesetzt. Dieser reagiert mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) zu einem Aktivester, wobei die Elektronendichte am Carboxyl-

Kohlenstoff so verringert wird, dass ein nucleophiler Angriff durch die freie Aminogruppe von Mannosamin leichter ermöglicht wird (Abb. 15).

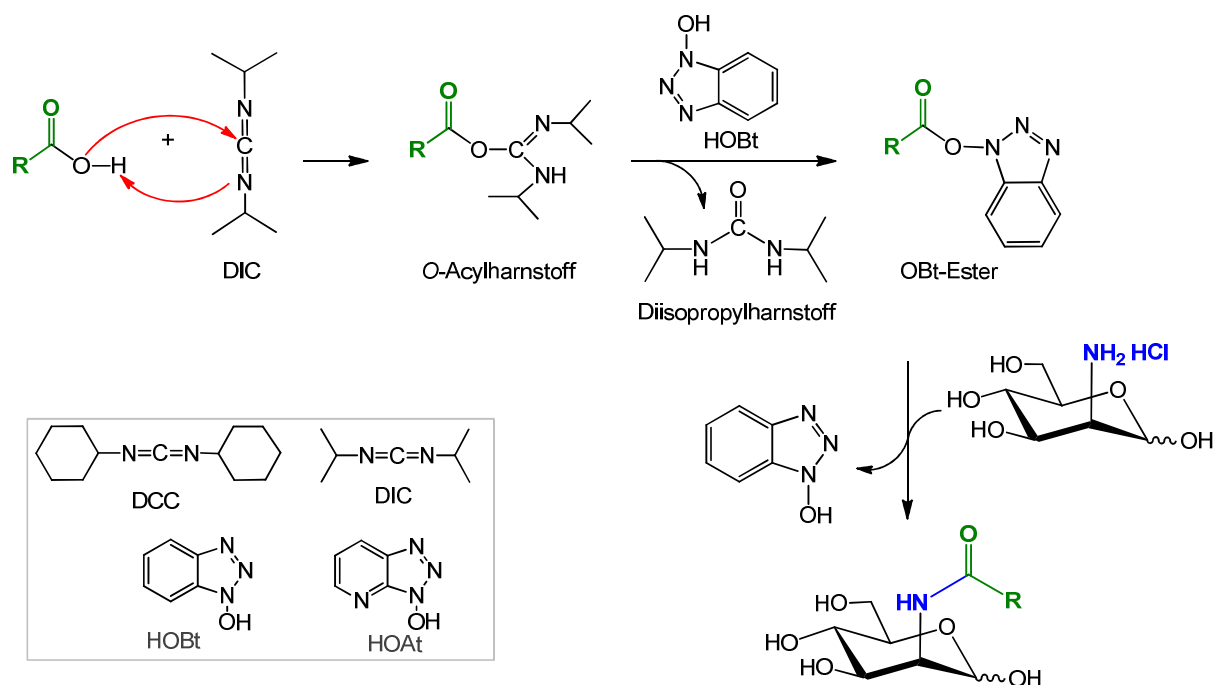


Abb. 15: Synthese der ManNAc-Derivate mittels DIC/HOBt-Aktivierung.

Tabelle 2: Die durch Amidkupplung synthetisierten *N*-Acyl-Mannosamin-Derivate.

Nr.	Verbindung	Ausbeute	Literatur
87		84%	
88		76%	
89		56%	

145		90%	[78, 159]
146		90%	[78]
147		78%	
151		52%	
152		81%	
153		76%	
154		52%	

Im Rahmen der Arbeit wurden die in der Tabelle 2 geleisteten verschiedenen *N*-modifizierten Mannosaminderivate mittels DIC/HOBt-Aktivierung aus Mannosamin und den entsprechenden Carbonsäuren nach chromatographischer Aufreinigung in guten bis sehr guten Ausbeuten erhalten. Im Vergleich zu der publizierten Synthese von ManNGc (**145**)^[78, 160] oder ManNACN₃ (**146**)^[78] benötigt das hier beschriebene Verfahren auf Grund der direkten Verwendung der entsprechenden Carbonsäure einen Schritt weniger, und zeigt auch eine sehr gute Ausbeute von 90%.

Die mit einem Glycosid gekoppelten Mannosamin-Derivate **87-89** wurden ebenfalls aus Mannosamin und den entsprechenden *O*-Acetyl-geschützten Glucosid- oder Lactosid-verlinkten Carbonsäuren **78**, **81** und **86** mittels der oben beschriebenen Kupplungsmethode hergestellt.

Von besonderem Interesse war dabei das Derivat **89**, da nach der *O*-Entschützung nach *Zemplen* (NaOMe/MeOH) das freie Lactose-Derivat **92** entsteht. Die besondere Struktur des Substrats **92** würde nach der NeuA-Katalyse und anschließender Nucleotid-Aktivierung in einer Sialyltransferreaktion nicht nur als Akzeptor, sondern gleichzeitig auch als Donor wirken können, wodurch es die Möglichkeit für eine Sialyltransferase-katalysierte Polymerisation bietet.

ManNAcN₃ (**146**) ist ein literaturbekanntes Substrat der NeuA.^[78] Ergänzend dazu wurden analog auch neue Azidderivate mit längeren Linkern (**151-153**) hergestellt, die bisher noch nicht in der NeuA-Reaktion Verwendung finden. Diese werden aus Mannosamin und der entsprechenden 5-Azidopentansäure **23**, 6-Azidohexansäure **24**^[161] bzw. 10-Azidodecansäure **25** in guten Ausbeuten hergestellt. Das Alkin-modifizierte ManNAc-Derivat, ManNHexinoyl **147**, wurde ebenfalls aus Mannosamin und 5-Hexinsäure mit einer Ausbeute von 78% synthetisiert. Die funktionelle Azid- oder Alkin- Gruppe ermöglicht leicht eine weitere Kopplung der ManNAc-Derivate (**146**, **147** und **151-153**) mit anderen Komponenten durch die Staudinger-Ligation^[162] oder die CuAAC-Click-Reaktion^[163].

Desweiteren wurde auch das mit einem Fluoreszenz-Chromophor verlinkte Mannosamin **154** als ein mögliches neuartiges NeuA-Substrat durch Kupplung von Mannosamin und 5-Acridon-pentansäure (**32**) synthetisiert, wobei letztere nach Literaturvorschrift^[164] aus 10*H*-Acridin-9-on (Acridon) (**26**)^[165] und Ethyl-5-brompentanoat mit NaH als Base und anschließender Entschützung des Zwischenprodukts **31** mittels 10%iger NaOH-Lösung erhalten wurde (Abb. 16).

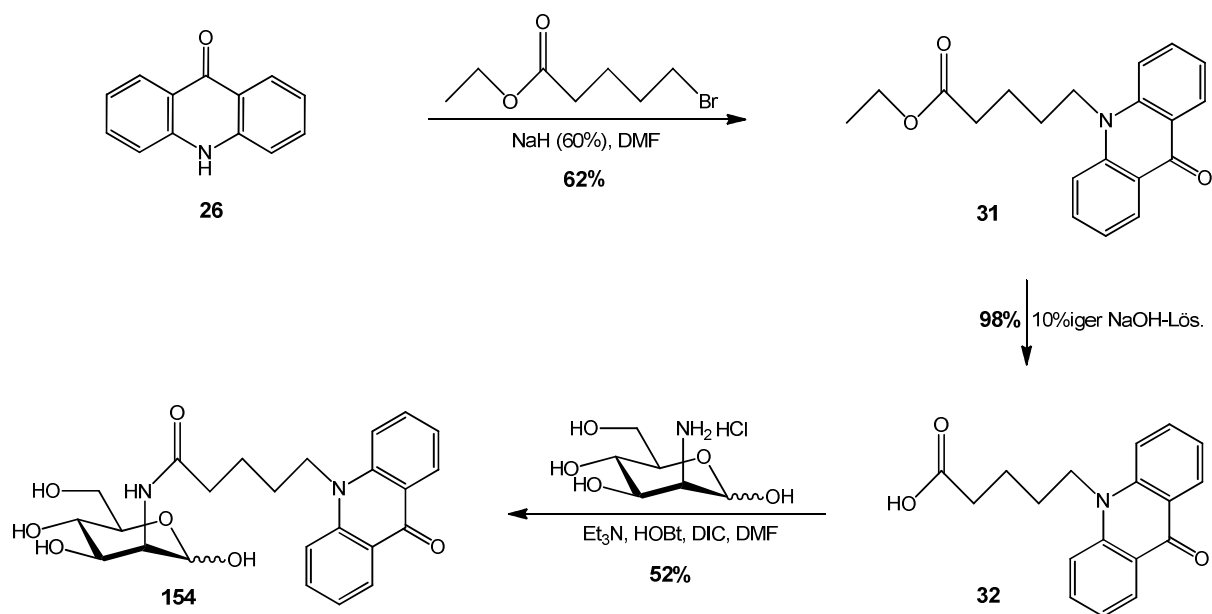


Abb. 16: Synthese des fluoreszenzmarkierten Mannosamin-Derivats **154**.

Die mit verschiedenen Glycosiden beladenen Carbonsäuren (**78**, **80** – **86**) wurden selbst aus Glycosylamin (**75** – **77**) und den Anhydriden, Carbonsäurechloriden bzw. Carbonsäuren mit der Hilfe von 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) oder DMAP/DCC und Pyridin als Hilfsbase synthetisiert. In Tabelle 3 sind die gewählten Reaktionsbedingungen und die isolierten Ausbeuten für die verschiedenen Produkte gezeigt. Für die Synthese von **81**, **82** und **85** aus Adipinsäure und Sebacinsäure wurde außer dem nucleophilen Katalysator DMAP zusätzlich noch das Aktivierungsreagenz DCC in der Reaktion eingesetzt. Die DC-Reaktionskontrolle zeigte eine mit steigender Kettenlänge wachsende Umsetzungsgeschwindigkeit. Leider ergab die Herstellung von Produkt **82** aus Sebacinsäure oder Sebacinsäuredichlorid nur eine unbefriedigende Ausbeute von nur 23% bzw. 30%, obwohl der Reaktionsansatz jeweils bereits nach einer Reaktionsdauer (RZ) von 2-5 h kein Ausgangsmaterial **75** mehr zeigte.

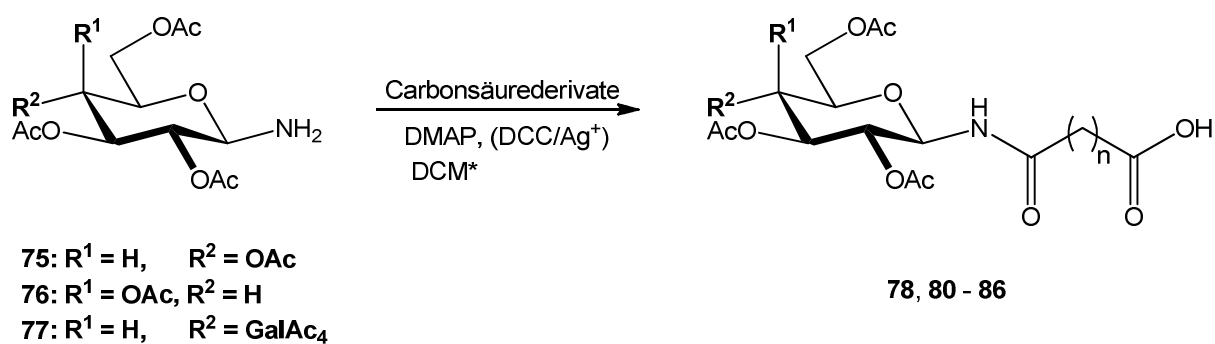


Tabelle 3: Zusammenstellung der synthetisierten Carbonsäure-verlinkten *N*-Glycoside.

Produkt	R ¹	R ²	n	Elektrophil	DMAP	DCC	AgNO ₃	RZ	Aus.
78	H	OAc	2		0.05 Äq.			46 h	80%
80	H	OAc	3		0.05 Äq.			32 h	84%
81	H	OAc	4		0.5 Äq.	1 Äq.		18 h	87%
82	H	OAc	8		0.5 Äq.	1 Äq.		3-5 h	23%
					0.5 Äq.		2 Äq.	2 h	30%
83	OAc	H	2		0.05 Äq.			24 h	69%
84	OAc	H	3		0.05 Äq.			20 h	35%
85	OAc	H	4		0.5 Äq.	1 Äq.		15 h	46%
86	GalAc ₄	H	2		0.08 Äq.			24 h	63%

Der sogenannte Steglich-Katalysator DMAP kann die Veresterung von sterisch anspruchsvollen sekundären und tertiären Alkoholen oder die Amidbildung mit Carbonsäureanhydriden unter milden Bedingungen effizient katalysieren. Mit Hilfe von DMAP als Katalysator wurden die literaturbekannten *N*-Glycoside **78**, **83**, und **86** aus den 1-Amino-Glycosiden (**75–77**) mit Bernsteinsäureanhydrid in guter Ausbeute hergestellt (Abb. 17).^[166] Für die Synthese von **83** war zwar noch eine Literaturvorschrift unter Verwendung von Diisopropylethylamin publiziert,^[167] die jedoch im Vergleich mit DMAP eine längere Reaktionszeit benötigte und keine gute Ausbeute lieferte. Deswegen wurde hier ausschließlich DMAP als nucleophiler Katalysator zur Synthese der neuartigen Produkte **80–82**, **84** und **85** verwendet.

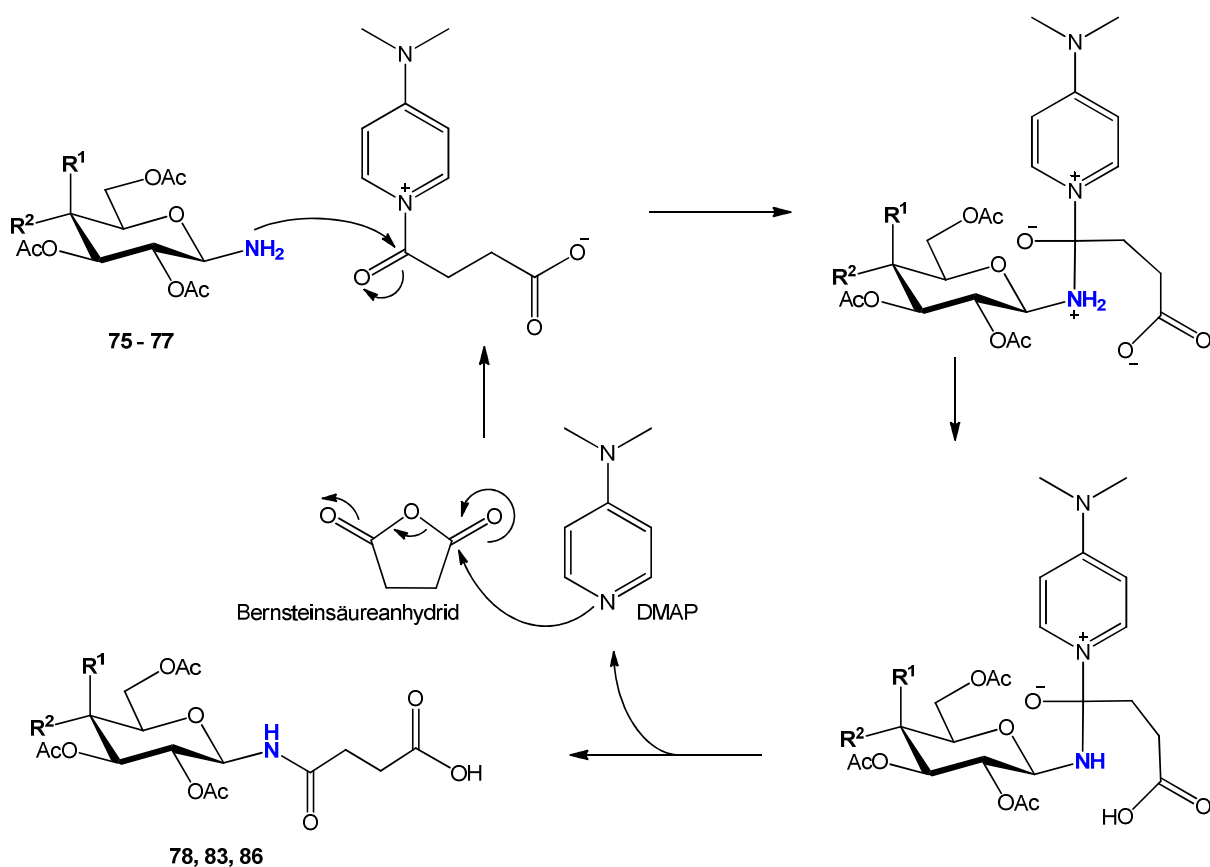


Abb. 17: Synthese der Carbonsäure-verlinkten *N*-Glycoside mittels DMAP-Katalyse.

Die 1-Amino-glycoside (**75 – 77**) können durch die Hydrierung der 1-Azido-glycoside (**70 – 72**) mit Wasserstoff an Pd/C als heterogenem Katalysator quantitativ erhalten werden (Abb. 18). Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und des Katalysators sind die Produkte NMR-spektroskopisch rein. Die Glycosylazide wiederum können aus den Bromiden wie z.B. GlcAc_4Br

(67), GalAc₄Br (68) und LacAc₇Br (69), durch eine milde Substitutionsreaktion mit NaN₃ in H₂O/Aceton bei RT über mehrere Stunden nahezu quantitativ synthetisiert werden.^[168] In Gegenwart von Wasser kann sich NaN₃ während der Reaktion sehr gut lösen, was die Aktivität der N₃-Ionen erhöht. Dies führt zu einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit und damit verbunden zu einem erhöhten Umsatz. α-Glycosylbromide sind wichtige Glycosyldonor-Substrate für die Synthese von Glycosiden und Oligosacchariden mittels der *Königs-Knorr*-^[169] oder der *Helferich*-Methode^[170, 171]. Nach *Hunsen et al.* können die α-Glycosylbromide 67 und 69 in einem Ein-Topf-System aus ungeschützten Zuckern unter milden Bedingungen in sehr guten Ausbeuten von mehr als 90% hergestellt werden,^[172] jedoch konnte α-Galactosylbromid 68 mittels dieser Ein-Topf-Strategie nur mit einer Ausbeute von 65% erhalten werden. Deswegen wurde die klassische Bromierungsmethode für die Synthese von GalAc₄Br (68) verwendet. Durch die Bromierung von peracetyliertem Galactosid mittels HBr (33% in AcOH)^[173] ist GalAc₄Br (68) fast quantitativ zugänglich.

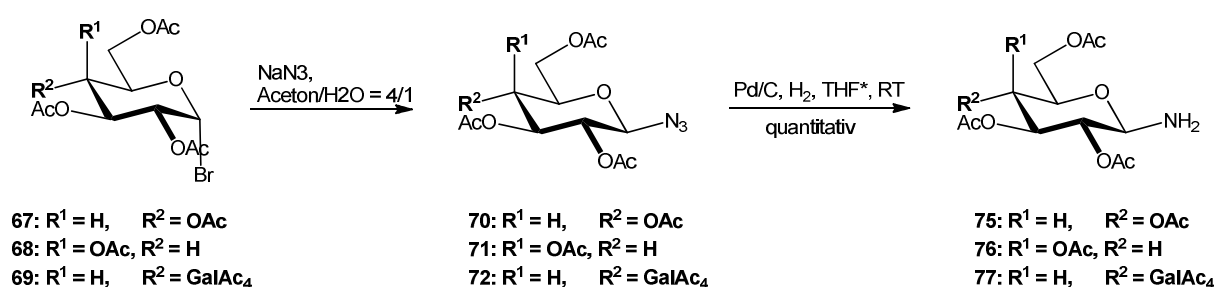
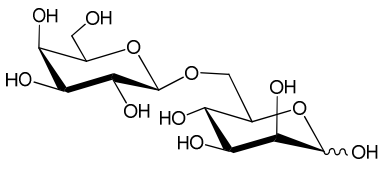
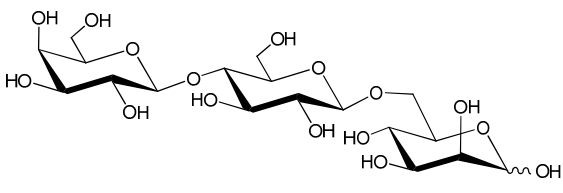
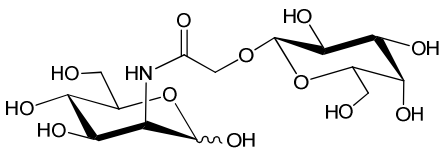
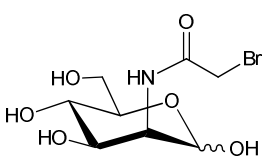
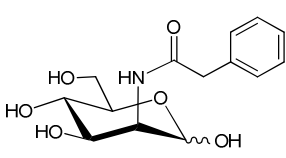
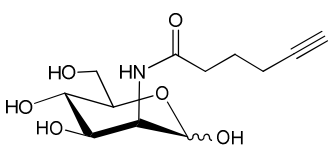
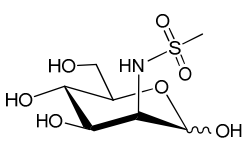
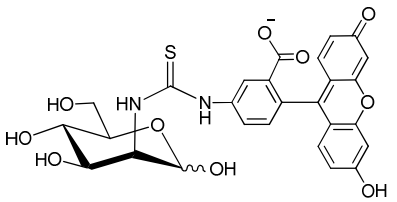


Abb. 18: Synthese von 1-Amino-Glycosiden.

Die in Tabelle 4 gezeigten ManNAc-Derivate, wie z.B. ManNAcBr (144) aus *N*-Hydroxy-succinimidylester, ManNPhAc (148) aus Phenyllessigsäureanhydrid, ManNBz (149) aus Benzoylanhydrid und ManNMs (150) aus Mesoylchlorid wurden unter basischen Bedingungen hergestellt. *Pan et al.* konnten zeigen, dass sowohl ManNPhAc auch ManNBz Substrate der NeuA sind, wobei ManNPhAc besser umgesetzt wird.^[174] Das Fluorescein-gekoppelte Mannosamin (155) wurde aus Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Mannosamin in DMSO bei RT synthetisiert und mittels Chromatographie über Kieselgel mit einer Ausbeute von 68% isoliert.

Tabelle 4: Synthetisierte Mannosamin- bzw. Mannose-Derivate.

Nr.	Verbindung	Ausbeute	Literatur
126		52% ^[a]	[83]
127		57% ^[a]	
141		25% ^[a]	[175]
144		86%	[69]
148		53%	[174]
149		81%	[174, 176]
150		70%	[69]
155		68%	

158		40% ^[b]
159		15% ^[b]

^[a] gesamte Ausbeute für Glycosylierung und Entschützung. ^[b] gesamte Ausbeute für Tosylierung und Substitution von Tosyl durch Azid.

Für die Synthese der Disaccharide oder Trisaccharide mit einem Glycosyl-Donor an der C2-Position von ManNGc und der C6-Position von Mannose wurden die peracetylierten D-Galactosyl- (**49**) und D-Lactosyl- (**51**) trichloracetimide^[177] als Glycosylierungsdonoren synthetisiert. Gal β 1,6Man (**126**), Lac β 1,6Man (**127**) und Gal β 1,2ManNGc (**141**)^[175] wurden nach der Reaktion aus dem entsprechenden Donor (**49/51**) und Akzeptor (**119/138**) mit Trimethylsilyltriflat (TMSOTf) oder Silbertriflat (AgOTf) als Promotor und anschließender Entschützung erhalten (Abb. 19). Nach Arbeiten von Yu *et. al.* handelt es sich bei **141** um ein Substrat der NeuA, aber die Umsetzung von **141** zu dem entsprechenden Sialinsäure-Produkt zeigte nur eine moderate Ausbeute.^[175] Durch die Verknüpfung des Galactose-Restes direkt an C2 der Mannose ist die Verbindung Gal α / β 1,2Man kein Substrat der NeuA.^[175]

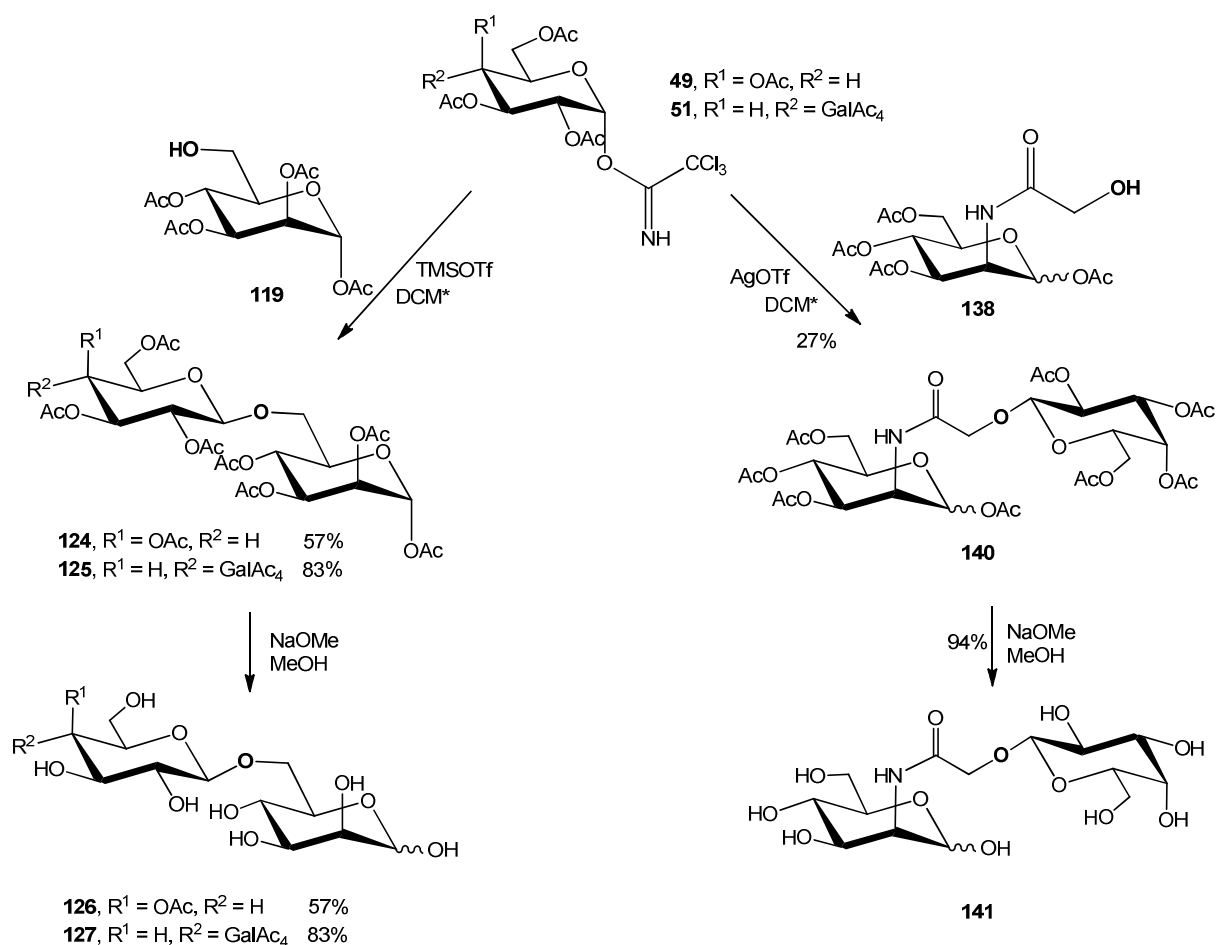


Abb. 19: Synthesewege zu den Disacchariden **126**, **141** und zum Trisaccharid **127**.

Die freie OH-Gruppe in **138** (Abb. 20) wurde durch Hydrierung der Benzyloxy-Schutzgruppe nahezu quantitativ erhalten. Unter ähnlichen Reaktionsbedingungen wurde auch Verbindung **139** (Abb. 20) mit freier Hydroxygruppe an einem längeren Linker erfolgreich hergestellt. Damit kann ein längerer Linker zwischen dem gekuppelten Glycosid und dem Mannosamin-Grundgerüst aufgebaut werden.

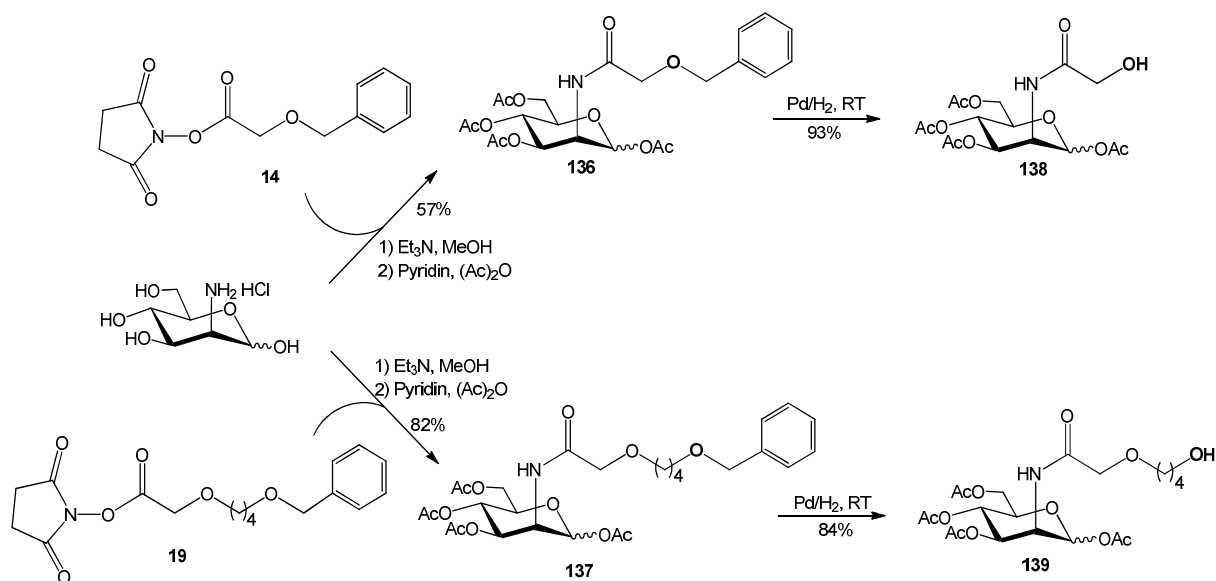


Abb. 20: Synthese *N*-acylierter Mannosamin-Derivate mit freier terminaler OH-Gruppe.

Die an C6 Azid-Gruppen-modifizierte Mannose-Analoga bzw. ManNAc-Derivate können durch die NeuA zu den entsprechenden nicht-natürlichen und wertvollen KDN9-N₃ und Neu5Ac9-N₃ umgesetzt werden. Die Synthese von Man6N₃ (**132**)^[178] konnte auf zwei Wegen erreicht werden (Abb. 21). Aus der durch Acetyl-Gruppen geschützten 6-Tosyl-Mannose (**129**) wurde das Produkt **132** mittels Substitution von Tosyl durch Azid und anschließender Entschützung mit einer Gesamtausbeute von 69% bezogen auf Mannose erreicht. Direkt aus 6-Tosyl-mannose und NaN₃ wird **132** jedoch nur mit einer Gesamtausbeute von 31% erhalten, obwohl dieser Weg mit nur 2 Schritten kürzer ist. Für die Synthese von ManNAc6N₃ (**135**)^[126] wurde C6-OH in ManNAc zuerst selektiv mit TosCl zum ManNAc6-Tos verestert. Die gute Tosyl-Abgangsgruppe wurde dann mit Azid zu **135** substituiert, wobei LiN₃ (20%ig in H₂O) mit 91% eine bessere Ausbeute als NaN₃ mit nur 34% lieferte.

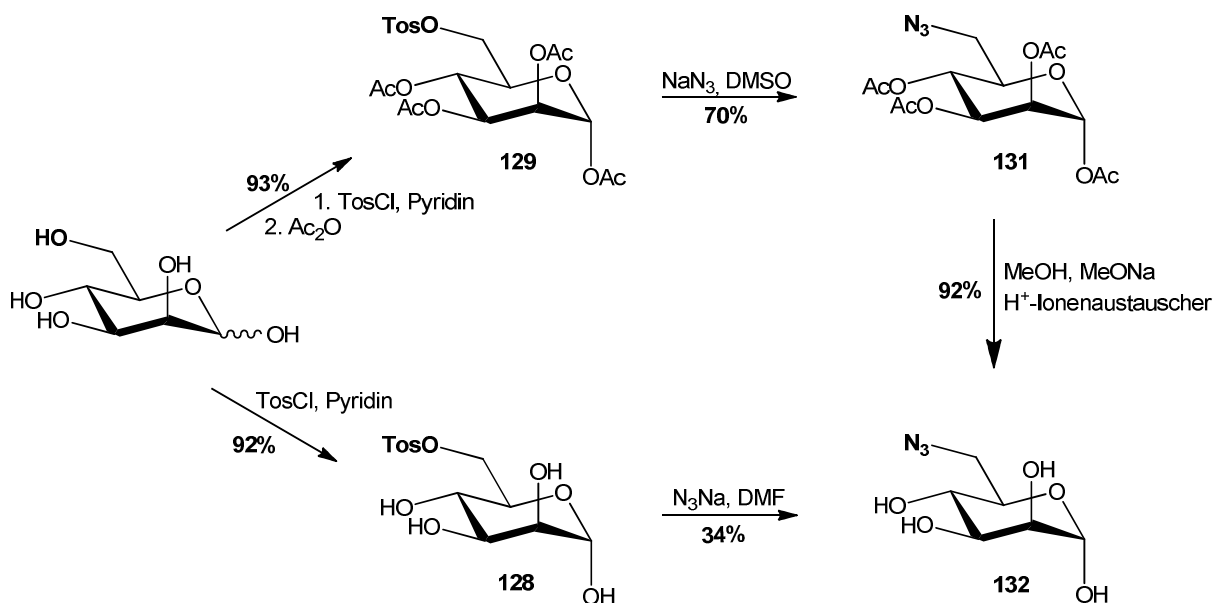


Abb. 21: Synthese von Man6N₃ (132).

Neben den mono-modifizierten Mannosamin- oder Mannose-Derivaten wurden auch die doppelt modifizierten Mannosamin-Derivate **158** und **159** synthetisiert, die zwei Azid-Gruppen (**158**) oder gleichzeitig eine Alkin- und eine Azid-Gruppe (**159**) enthalten. Nach C6-O-Tosylierung von ManNAcN₃ (**146**) und ManNH₆ (**147**) und anschließender Substitution mit LiN₃ (20%ig in H₂O) oder NaN₃ in DMF wurden die gewünschten Produkte ManNAcN₃-6N₃ (**158**) und ManNH₆-6N₃ (**159**) erhalten (Abb. 22). Bei **159** handelt es sich um ein interessantes Molekül, da mittels einer intramolekularen Click-Reaktion eine Triazol-Brücke (**159b**) zwischen der C2- und C6-Position aufgebaut werden könnte.

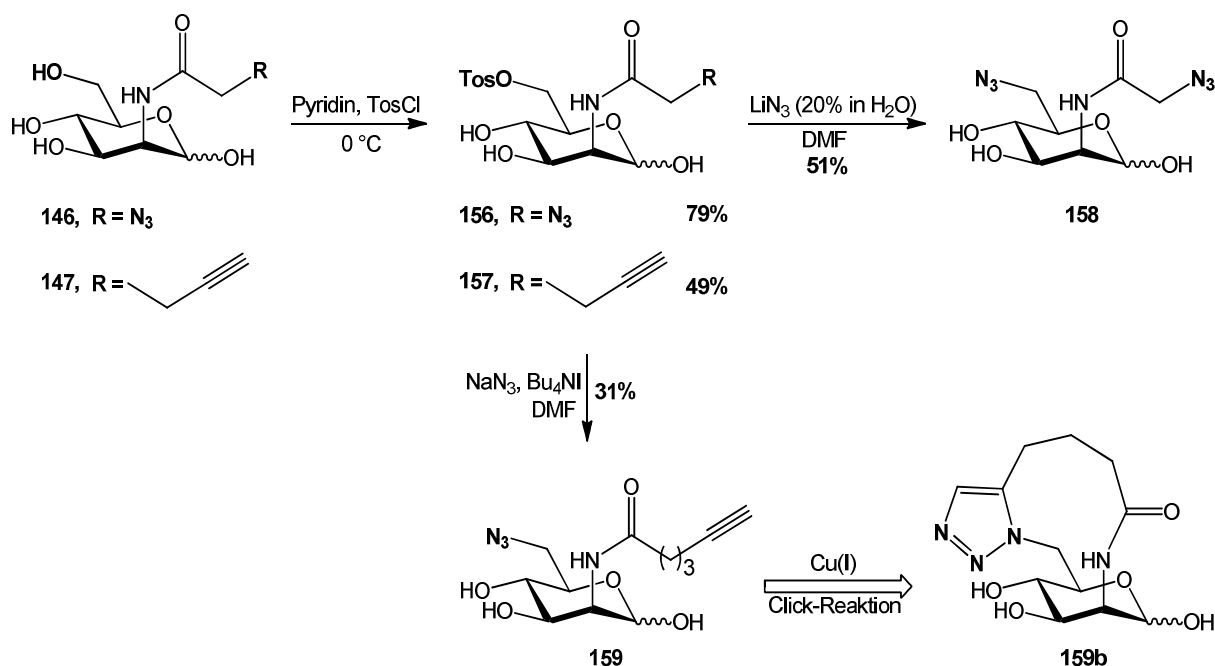
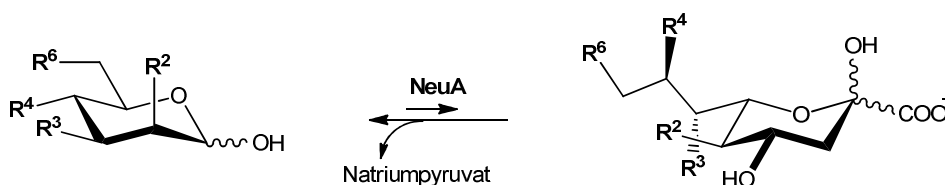


Abb. 22: Synthese von doppelt modifizierten Mannosaminderivaten.

3.1.2. Enzymatische Synthese von neuen funktionellen Sialinsäuren mit der *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA)

Aus den Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen ist bekannt, dass die NeuA eine sehr hohe Substrattoleranz zeigt und nicht nur die Umsetzung von an C2-, C4- und/oder C6-substituierten ManNAc- oder Mannose-Derivaten (Abb. 23),^[78, 82, 104, 110, 126, 159, 174, 175, 179-182] sondern auch die einiger Pentosen und ihrer Analoga zu den entsprechenden Sialinsäuren katalysieren kann.^[82, 86, 179, 183] Außerdem kann die NeuA aus *E. coli* auch für die Synthese von KDN, epi-KDN oder Neu5Gc enthaltende Disacchariden,^[69, 175] wie z.B. Gal α /1,7/1,8/1,9KDN, Glc β 1,7/1,9KDN,^[175] Gal α /1,5Neu5Gc,^[175] GlcNAc β 1,7/1,9KDN^[69] und Gal/Glc α 1,9epi-KDN^[69] verwendet werden. Auch jüngere Arbeiten aus dem eigenen Arbeitskreis belegen die Substrattoleranz der NeuA. Interessanterweise konnte selbst ein großes Molekül mit vier terminalen Mannoseeinheiten, das aus Mannose und einem Alkin-gekoppelten Tetraether durch Click-Reaktion gebildet wurde, von der NeuA gut akzeptiert und zu dem entsprechenden tetrameren KDN-Derivat umgewandelt werden.^[69]



$R^2 = \text{NHAc, NHGc, OH}$ oder seine Derivaten

$R^3 = \text{OH}$ oder OAc

$R^4 = \text{OH, OAc, SO}_3\text{H}$ oder OMe

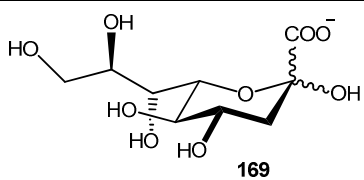
$R^6 = \text{N}_3, \text{OAc, OH}$ oder OH-Derivaten

Abb. 23: Literaturbekannte Synthesen von Sialinsäuren aus unterschiedlich modifizierten ManNAc- oder Mannose-Vorstufen.

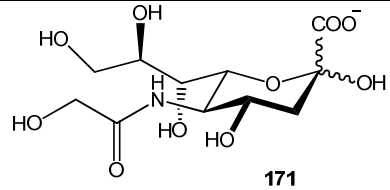
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine kommerzielle NeuA-Präparation für die Herstellung der unterschiedlichen neuartigen, nicht-natürlichen Sialinsäuren verwendet. Da die NeuA die reversible Spaltung von Neu5Ac katalysiert, wird in vielen Arbeiten das preiswerte Pyruvat mit bis zu zehnfachem Überschuss zur enzymatischen Synthese von Sialinsäuren eingesetzt, wodurch das Gleichgewicht zur Seite der Neuraminsäure-Bildung verschoben werden kann. Leider erwies sich der hohe Überschuss an Pyruvat bei den eigenen Versuchen als nachteilig, da sich dieses bei der chromatographischen Aufreinigung nur sehr schlecht oder unvollständig vom Produkt abtrennen ließ. Deswegen wurde in den folgenden NeuA-Reaktionen Pyruvat meist nur im dreifachen Überschuss bzw. sogar im leichten Unterschuss eingesetzt. Bei der Aufarbeitung der Reaktionsmischung ist es sehr wichtig, dass das Enzym zuerst durch die Zugabe von EtOH bei 4 °C für 3-5 h vollständig denaturiert und abzentrifugiert wurde. Dies verhindert die Rückspaltung der Sialinsäure während der Aufarbeitung zu Pyruvat und den entsprechenden Hexosederivaten. Die Natriumsalze der Sialinsäuren (Tabelle 5) wurden säulenchromatographisch über BioGel-P2 mit H₂O als Elutionsmittel aufgereinigt und im Anschluss lyophilisiert.

Tabelle 5: Mittels *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase synthetisierte Sialinsäure.

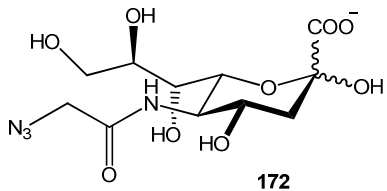
synthetisierte Sialinsäure	Ausb. ^[a]	synthetisierte Sialinsäure	Ausb. ^[a]
<p style="text-align: center;">161</p>	83%	<p style="text-align: center;">162</p>	79%



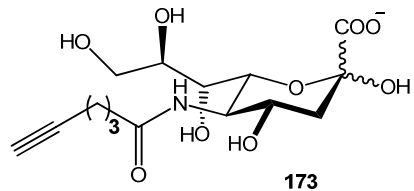
75%



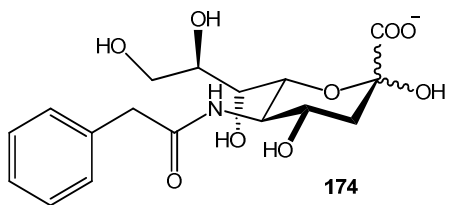
75%



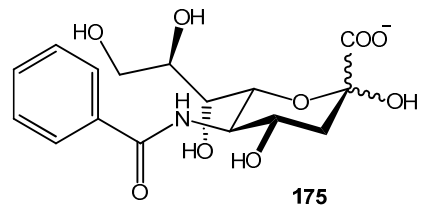
78%



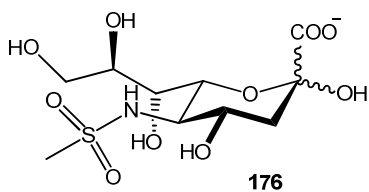
73%



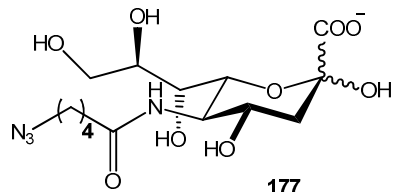
65%



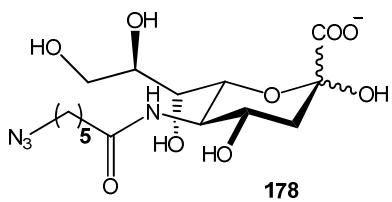
85%



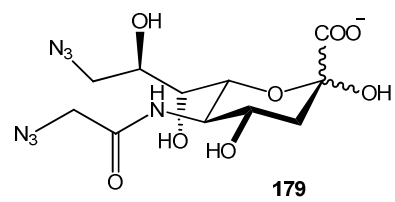
60%



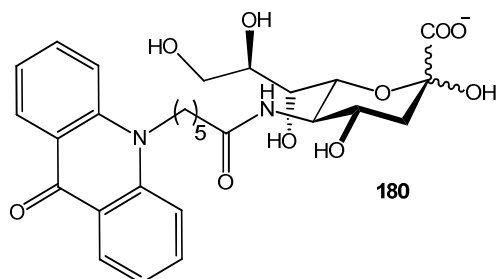
60%



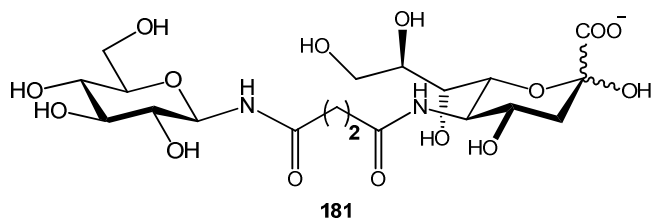
65%



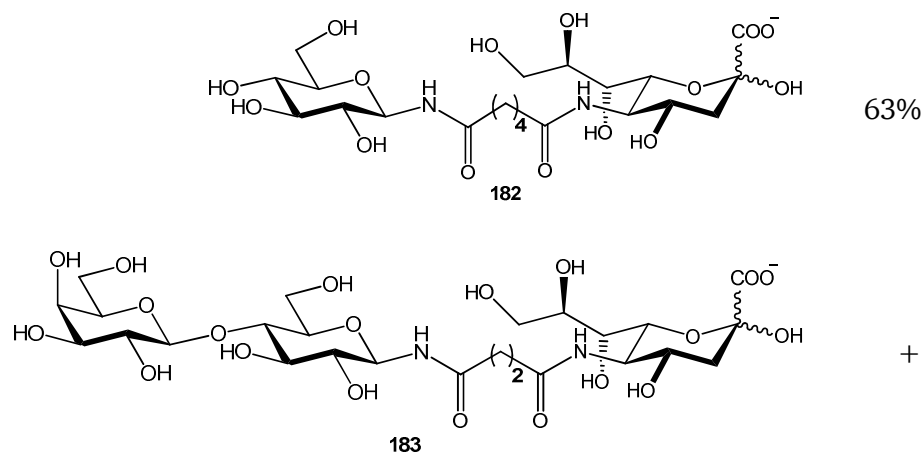
63%



+



56%



^[a]: Ausbeute für isolierte Produkte; +: Umsetzung nur durch DC-Kontrolle gesichert.

Wie in Tabelle 5 gezeigt, wurden die verschiedenen für die Kinetikuntersuchungen der enzymatischen Nucleotidaktivierung wichtigen Sialinsäuren, inklusiv C9-Azido-modifizierten Sialinsäuren KDN-9N₃ (**161**),^[126] Neu5Ac-9N₃ (**162**),^[110] der deaminierten KDN (**169**),^[179] sowie der *N*-Acyl-Varianten Neu5Gc (**171**),^[159, 184] Neu5AcN₃ (**172**),^[78] Neu5PhAc (**174**)^[174, 185] und Neu5Bz (**175**)^[176] durch NeuA-Katalyse in guten Ausbeuten produziert. Das bisher nur für die bekannte *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase als Substrat bekannte ManNMs (**151**)^[69] konnte erstmals auch durch die NeuA zur Sulfonamid-analogen Sialinsäure Neu5Ms (**176**) mit einer Ausbeute von 60% umgesetzt werden. Erstmals konnten auch die mit länger-kettigen Alkin- und Azid-modifizierten Sialinsäuren **173**, **177** und **178** aus den entsprechenden Mannosaminderivaten erfolgreich erhalten werden. Außerdem war die NeuA in der Lage, ein mit einer Azid-Gruppe doppelt modifiziertes Mannosamin-Derivat zum entsprechenden Addukt Neu5N₃-9N₃ (**179**) mit einer Ausbeute von 63% zu katalysieren.

Die mittels Bernsteinsäure- bzw. Adipinsäurelinkern mit Glucose verknüpften, sterisch anspruchsvollen Sialinsäuren **181** und **182** wurden ebenfalls erstmals durch NeuA-Katalyse mit Ausbeuten von 56% bzw. 63% synthetisiert. Die Reaktion des Lactose-verlinkten Mannosaminderivats **92** durch NeuA-Katalyse zu **183** wurde durch DC-Kontrolle beobachtet und durch MS-Analyse des Produkts verifiziert, wobei der Umsatz vermutlich bedingt durch den größeren Lactose-Rest deutlich geringer war als der Umsatz von **90** zu **181**. Vermutlich spielt in dieser Konstrukten auch die Länge des Linkers zwischen Glucose- und Mannosamin-Einheiten eine wichtige Rolle für die NeuA-Aktivität, wie schon Yu *et al.* in einer früheren Arbeit belegen konnten.^[175]

Das Acridon-modifizierte Mannosederivat (160) wurde laut DC-Kontrolle zwar von der NeuA akzeptiert, jedoch war nur ein geringer Umsatz zu 180 erreichbar. Ein Grund dafür könnte die begrenzte Löslichkeit des Edukts 160 wegen der hydrophoben Aromaten-Einheit im salzhaltigen Reaktionsmedium sein. Eine bessere Löslichkeit kann zwar durch Zugabe von ca. 30-50% DMSO zum Reaktionsgemisch erreicht werden, jedoch wird möglicherweise dadurch die Enzymaktivität inhibiert. Daher wäre vermutlich ein erfolversprechenderes Vorgehen für die Synthese von 180 zuerst die Herstellung einer *N*-geschützten Sialinsäure gefolgt von Entschützen und postsynthetischer Verknüpfung mit dem Acridon-Linker.

3.1.3. Chemische Modifizierung von Sialinsäuren

Synthese der verkürzten Neu5Ac-Analoga: C7-Neu5Ac

Im Vergleich zu Neu5Ac, einer C₉- α -Ketosäure, ist C7-Neu5Ac (168) (*N*-Acetyl-5-amino-3,5-dideoxy- α -L-arabino-2-heptulopyranosonsäure) eine um zwei CHOH-Gruppen verkürzte Sialinsäure. Die Synthese von 168 konnte durch die Verkürzung der Glyceroleinheit der anomer methylgeschützten Neu5Ac (165) mittels Periodat-Spaltung und anschließender Reduktion der entstandenen Aldehydform 166^[186] sowie saurer Glycosidspaltung von 167 mit einer guten Gesamtausbeute erreicht werden. Das Aldehyd 166 ist auch eine wichtige Ausgangsverbindung für die Synthese von verschiedenen C7-Neu5Ac-Derivaten, wie z.B. 166a (Abb. 24), die als Inhibitoren von Neuraminidase, Hämagglutinin, eines Hämagglutinin-Esterase-Fusionsglycoproteins und bestimmter Viren entwickelt wurden.^[186]

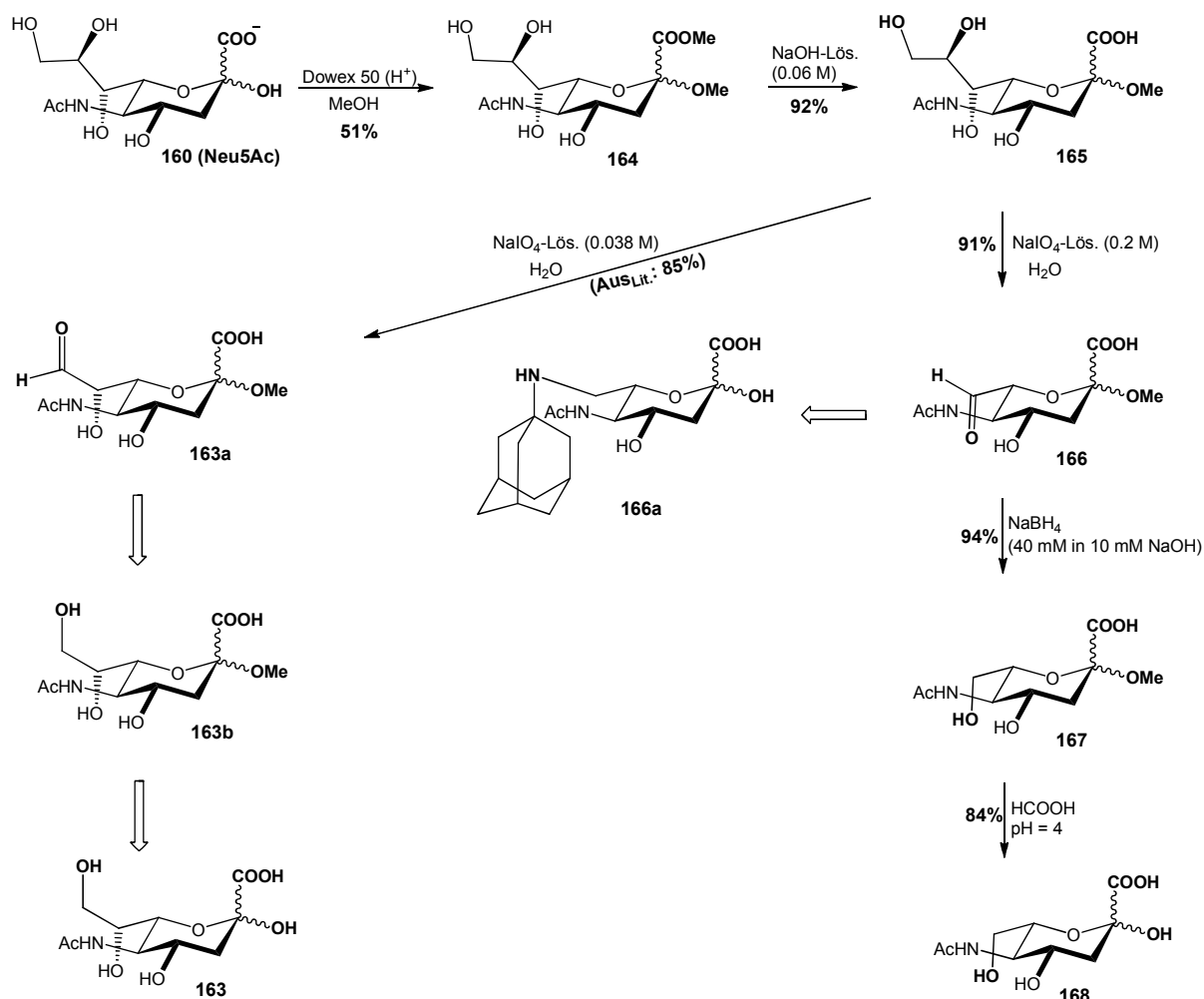


Abb. 24: Synthese von C7-Neu5Ac **168**.

Als Ausgangsmaterial für die Synthese von **168** wurde kommerzielle Neu5Ac verwendet. Um die Glyceroleinheit der Neu5Ac selektiv oxidieren zu können, wurden die C1- und C2-Positionen zuerst in saurem MeOH unter Rückfluss geschützt. Da nur die α -Form des Produkts aus MeOH/Et₂O (1/3) kristallisiert, wurde das so gereinigte Produkt α -**164** nur mit einer Ausbeute von 51% erhalten. Eine bessere Ausbeute konnte durch Aufreinigung mittels Säulenchromatographie erreicht werden, wobei das Produkt als gemischtes α -/ β -Glycosid isoliert wird. Durch alkalische Verseifung wurde die C1-Methylesterfunktion in **164** zur freien Carbonsäure **165** entschützt. Der entscheidende Schritt in der Synthese von C7-Neu5Ac ist die Oxidation von **165** mittels Periodatspaltung. Über die Stöchiometrie bzw. Konzentration der $NaIO_4$ -Lösung kann die Produktselektivität zu **166** oder **163a** gesteuert werden. Letzteres ist die Vorstufe des verkürzten Neu5Ac-Derivats C8-Neu5Ac (**163**). Während eine IO_4^- -Konzentration von 0.2 M das Produkt **165** mit einer Ausbeute von 91% (AusLit: 85%)^[186]

lieferte, wurde bei einer Konzentration von 0.038 M dagegen selektiv das Aldehyd-Derivat **163a** mit einer Literatur-Ausbeute^[186] von 85% gebildet.

Durch Reduktion der Aldehyd-Gruppe in **166** mittels NaBH₄ wurde die Vorstufe **167** der C7-Neu5Ac erhalten. Die Glycosid-Spaltung von **167** unter milden Bedingungen mittels wässriger Ameisensäure führte zu C7-Neu5Ac (**168**) in guter Ausbeute (Abb. 24). C8-Neu5Ac **163** konnte analog aus **163a** hergestellt werden.

Synthese der Amin-modifizierten Neu5Ac-Derivate

Die Synthese von über die C5-Aminogruppe gekoppelten Sialinsäuren bietet einen einfachen Syntheseweg für die Bildung von substituierten Sialinsäuren. Ähnlich hatten *Gross et al.* eine fluoreszenzmarkierte Sialinsäure, 9-Fluoresceinyl-Neu5Ac (Abb. 25), aus der 9-Amino-Neu5Ac (**183**) durch Kupplung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) unter milden Bedingungen synthetisiert.^[187]

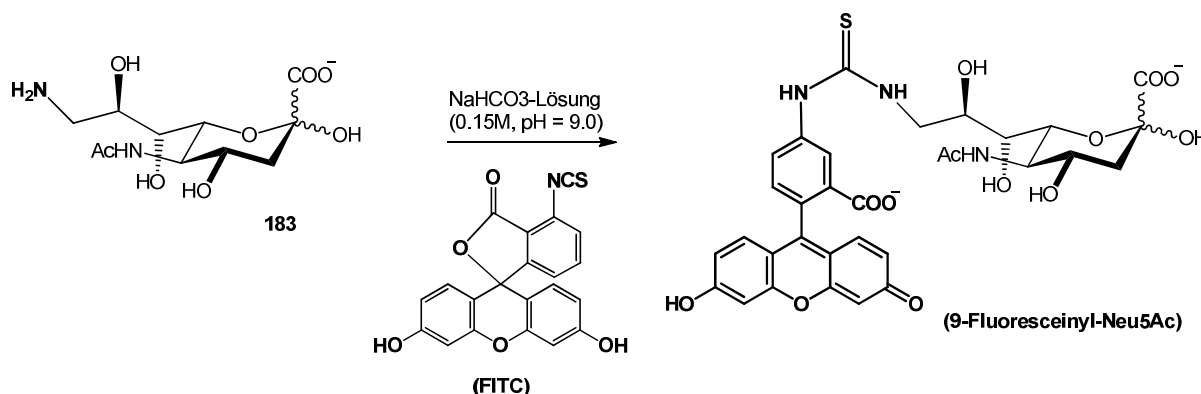


Abb. 25: Synthese von 9-Fluoresceinyl-Neu5Ac^[187].

Für die Synthese von Aminen aus den entsprechenden Azidverbindungen stehen zwei erprobte Methoden zur Verfügung. Diese Transformation kann entweder mittels Staudinger-Reduktion mit Triphenylphosphin^[188, 189] oder durch heterogene Hydrierung mit H₂/Pd^[190-192] erreicht werden. Ein Vorteil der Staudinger-Reaktion sind die sehr milden und neutralen Reaktionsbedingungen. Das Phosphin (PPh₃) bildet mit dem Azid zuerst ein *cis*-konfiguriertes Phosphazid, nach Abspaltung von Stickstoff wird das resultierende Phosphazen durch

Hydrolyse mit H₂O in Phosphinoxid und die gewünschte Aminverbindung gespalten. Mit dieser Methode wurden Neu5Ac-9NH₂ (**184**) und Neu5AcNH₂ (**185**) aus Neu5Ac-9N₃ (**162**) bzw. Neu5AcN₃ (**172**) bei RT quantitativ gebildet (Abb. 26). Nach Filtrieren und Entfernen des Lösemittels konnten die beiden Amine jeweils als farbloser Feststoff erhalten werden.

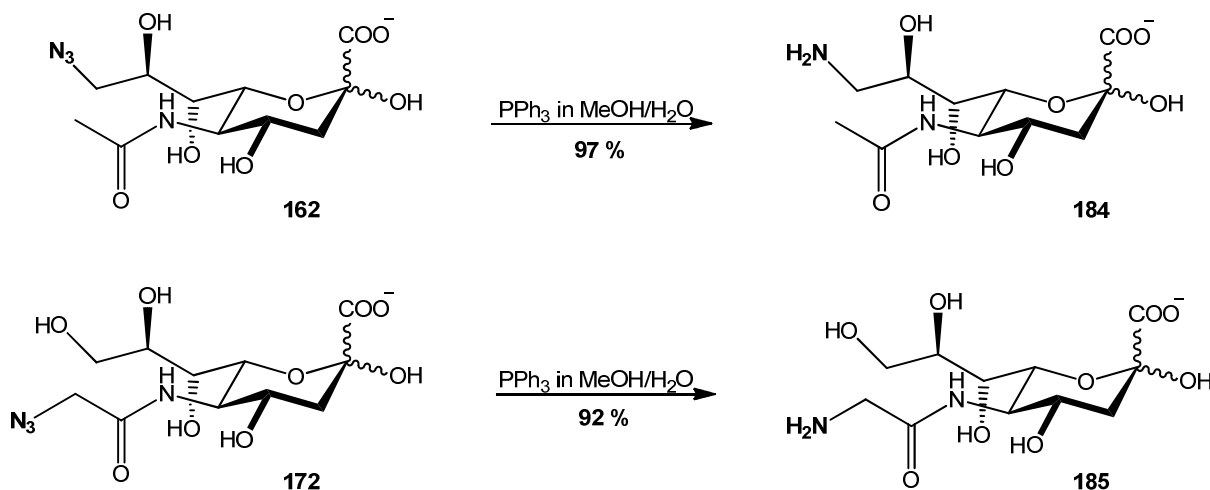


Abb. 26: Synthese der mit Amin derivatisierten Sialinsäuren **184** und **185**.

Demgegenüber verlief jedoch die Umsetzung von Neu5PenN₃ (**178**) zu Neu5PenNH₂ (**187**) durch die Staudinger-Reaktion unter Standardbedingungen nicht vollständig. Es wurde nicht nur das erwartete Produkt **187** mit einer Ausbeute von 30% isoliert, sondern auch das Phosphazin-Zwischenprodukt **178b** mit 19% (Abb. 27). Interessanterweise war das Phosphazin **178b** sogar während der chromatographischen Aufreinigung über BioGel P2 stabil und konnte durch NMR spektroskopische Analyse eindeutig identifiziert werden. Ein möglicher Grund liegt darin, dass das Phosphazin **178b** durch die aliphatische Kette eine hohe konformative Flexibilität aufweist, so dass **178b** möglicherweise durch die Ionenpaarwechselwirkung mit dem Carboxylatrest oder Dipolwechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbildung mit den OH-Gruppen der Glycerol-Einheit stabilisiert wird. Bei einem pH-Wert von 2.0 hydrolysiert das Phosphazin langsam zum gewünschten Amin **187**.

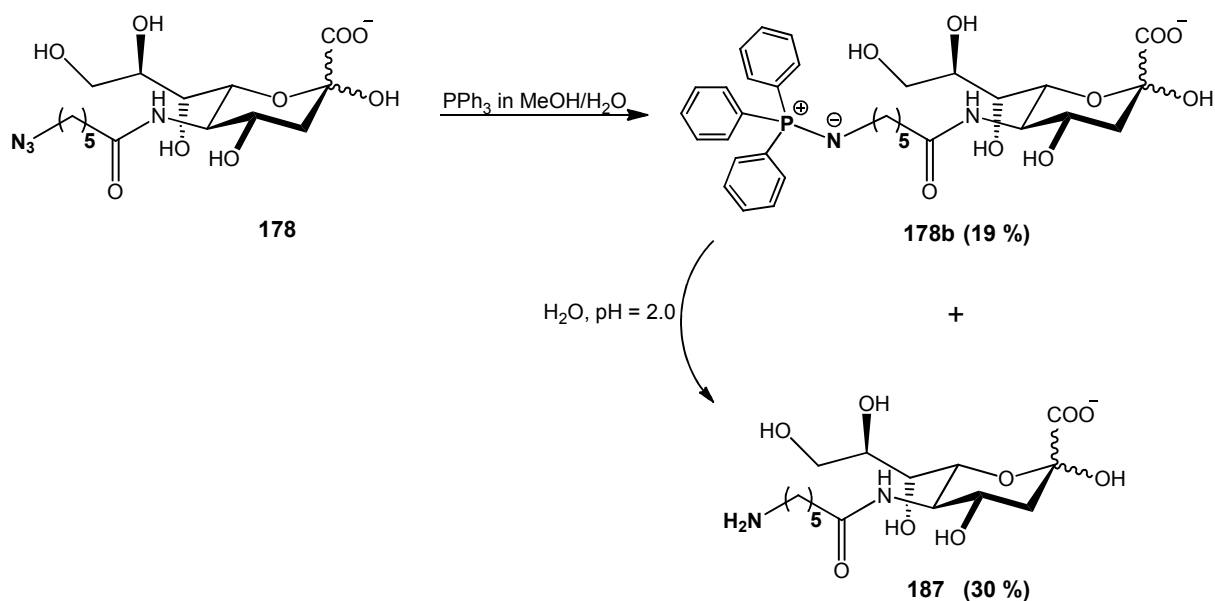


Abb. 27: Synthese der Amin-modifizierten Sialinsäure **187** mittels Staudinger-Reaktion.

Vor dem Hintergrund dieser Erfahrungen wurde als alternative Methode die Hydrierung unter H_2 -Atmosphäre mit dem *Lindlar*-Katalysator^[193] 5% Pd/CaCO_3 in H_2O ($\text{pH} 9.0$, mit NH_4OH eingestellt)^[192] für die Synthese der Amino-verlinkten Sialinsäuren **186** und **187** verwendet (Abb. 28). Diese Methode lieferte eine vollständige Umsetzung der Azide **177** und **178** zu den Aminen **186** und **187**, die nach einfachem Filtrieren über Kieselgur mit anschließender Gefriertrocknung jeweils als weiße Feststoffe erhalten wurden.

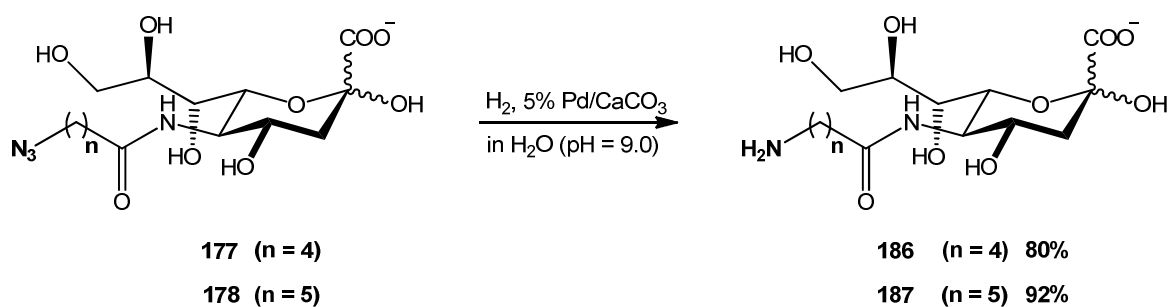


Abb. 28: Synthese der aminoacylierten Sialinsäuren **186** und **187** durch heterogen katalysierte Hydrierung.

3.2.CMP-Aktivierung durch die CMP-Sialat-Synthetase: Entwicklung einer neuen Assay-Methode und präparative Anwendungen

3.2.1. Literaturübersicht zu bekannten Assay-Methoden

Wegen der Bedeutung von Sialokonjugaten wurden auch verschiedene Assay-Methoden für die CMP-Sialat-Synthetase (CSS) entwickelt. Eine klassische, seit langer Zeit verwendete Methode ist der Thiobarbitursäure-(TBA)-Assay.^[194, 195] In diesem Assay wird zunächst die durch die CSS-Aktivierungsreaktion nicht umgesetzte Sialinsäure durch NaBH₄ reduziert, dadurch das Reaktionsprodukt CMP-Neu5Ac im sauren Milieu (H₃PO₄) zu CMP und Neu5Ac hydrolysiert wird. Anschließend wird die entstandene Neu5Ac mittels Periodat zur 2,4-Dioxobutansäure oxidiert, die mit Thiobarbitursäure zu einem roten Farbstoff gekoppelt wird (Abb. 29). Durch Extraktion des Farbstoffs mit Cyclohexanon wird die Farbe des gekoppelten Produkts intensiver, wodurch die messbare Extinktion und Selektivität gesteigert werden kann. Die Absolut-Konzentration von Neu5Ac wird durch photometrische Bestimmung der organischen Phase bei 549 nm mit Hilfe einer Eichgerade bestimmt. Leider ist diese Methode nicht für alle Neu5Ac-Derivate anwendbar, weil manche Neu5Ac-Derivate nicht mit Periodat reagieren können.

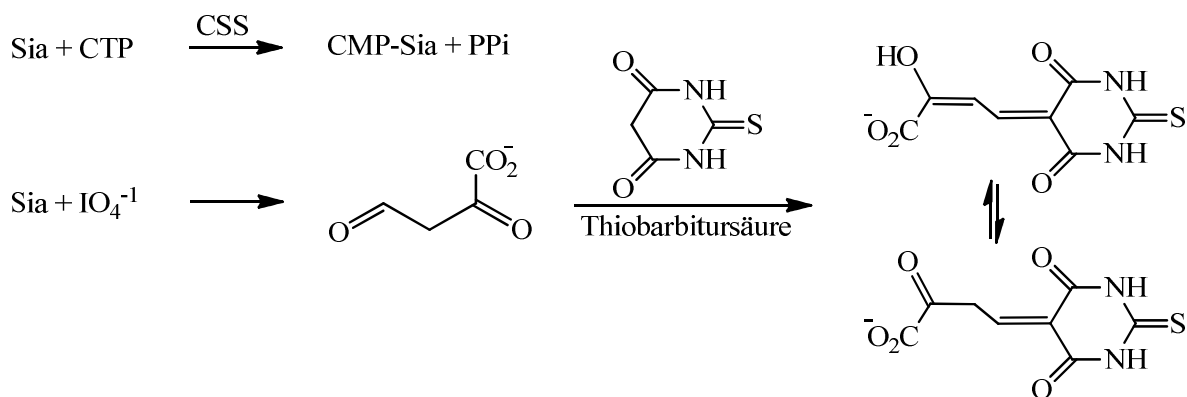


Abb. 29: Ablauf des TBA-Assays.

Ein weiteres Verfahren beruht auf einem Phosphat-Assay,^[104] wobei das aus der Aktivierungsreaktion entstehende Pyrophosphat durch anorganische Pyrophosphatase zu zwei Äquivalenten Phosphat gespalten wird, welches dann mit Malachitgrün reagiert (Abb. 30). Diese Farbreaktion wird durch die Zugabe von Citrat-Lösung gestoppt. Die Konzentration des

produzierten Phosphatkomplexes wird bei 646 nm gemessen^[196] und dann mit Hilfe einer Phosphat-Eichgerade quantifiziert. Ein Unit an CSS-Aktivität ist definiert als die Enzymmenge, die 2 μmol Phosphat (entsprechend 1 μmol Pyrophosphat) pro Minute aus CTP und Neu5Ac unter den Reaktionsbedingungen freisetzt.

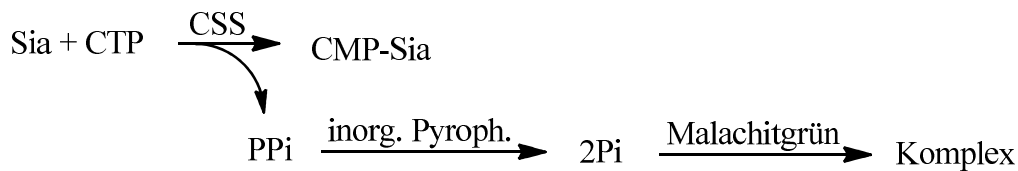


Abb. 30: Ablauf des Phosphat-Assays

Fujita et. al. entwickelten 2005 einen photochemischen Enzymassay^[197] durch Kopplung mit zwei Hilfs-Enzymen, nämlich einer Sialinsäurelyase und einer Lactatdehydrogenase. Obwohl man längere Zeit (ca. 3h) für eine Messung benötigt, soll das System auch für High-Throughput-Assay-Systeme verwendbar sein. Hierbei wird Sialinsäure mit CTP durch die CSS zu CMP-Sia umgesetzt, worauf übrig gebliebene Sialinsäure durch eine Sialinsäurealdolase zu ManNAc und Pyruvat zersetzt wird. Das entstandene Pyruvat wird unter NADH-Verbrauch durch Lactatdehydrogenase zu Lactat reduziert (Abb. 31). Die restliche Konzentration von NADH wird bei 340 nm photometrisch gemessen.

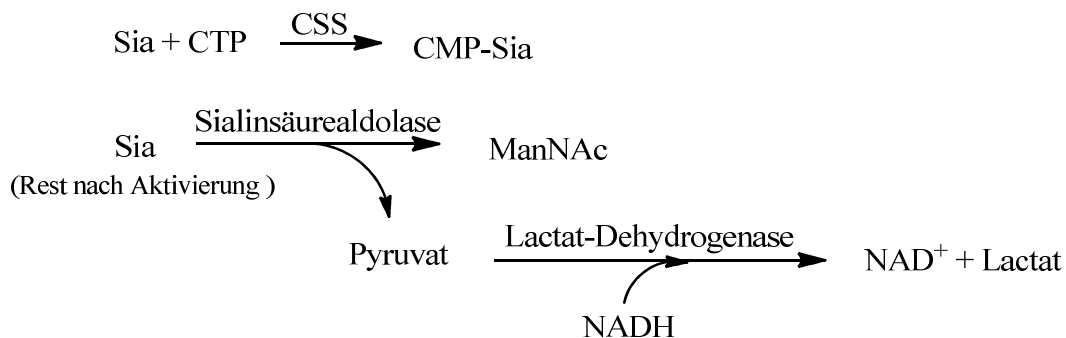


Abb. 31: Ablauf des NADH-Assays

Außer den erwähnten photometrischen Assay-Methoden gibt es weitere Verfahren ohne Verwendung zusätzlicher Enzyme, die mit HPLC, Kapillar-Elektrophorese oder ESI-MS

kombiniert werden. Dabei wird die Reaktionsmischung nach der Aktivierung zunächst durch Zugabe von eiskaltem Acetonitril^[198, 199], EDTA^[200], 70% MeOH und AMP^[96], oder kaltem EtOH^[201] gestoppt. Die Mischung wird dann zentrifugiert und im Überstand wird das Produkt CMP-Neu5Ac mittels HPLC, Kapillar-Elektrophorese oder ESI-MS bestimmt. Ein großer Nachteil dieser Verfahrensweise ist, dass die gebildete CMP-Sialinsäure sich in kaltem EtOH oder Acetonitril schlecht löst, so dass die gemessene Menge des CMP-Produkts fehleranfällig ist. Ein weiterer Nachteil ist die Verwendung von teuren Geräten, was den Einsatz einschränkt.

Alle oben beschriebenen Assaymethoden sind diskontinuierlich, weil die enzymatische Reaktion gestoppt werden muss. Deswegen sind solche Methoden nicht nur zeitaufwendig und umständlich, sondern beinhalten auch Probleme bei der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit und sind fehleranfällig wegen der Verzögerung durch den Reaktionsabbruch.

Die bisher einzige kontinuierliche Assaymethode ist der Mercaptomethylpurin-Assay^[202, 203]. In diesem Assay wird das bei der Aktivierung gebildete Pyrophosphat zuerst durch anorganische Pyrophosphatase zu zwei Äquivalenten Phosphat gespalten, das dann durch eine Purinnucleosidphosphorylase aus 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurinribonucleosid das Purinanalogon freisetzt, dessen Absorption bei 360 nm selektiv vermessen werden kann (Abb. 32). Die Konzentration des aus der Aktivierung produzierten Pyrophosphats wird mit Hilfe einer Pyrophosphat-Eichgerade berechnet.

Der Nachteil dieser Assaymethode ist, dass dazu insgesamt 3 gekoppelte Enzymreaktionen sowie das teure Ribonucleosid verwendet werden. Außerdem kann das Substrat CTP wegen Inhibitionseffekten nicht in gesättigter Konzentration im Assay eingesetzt werden.^[203]

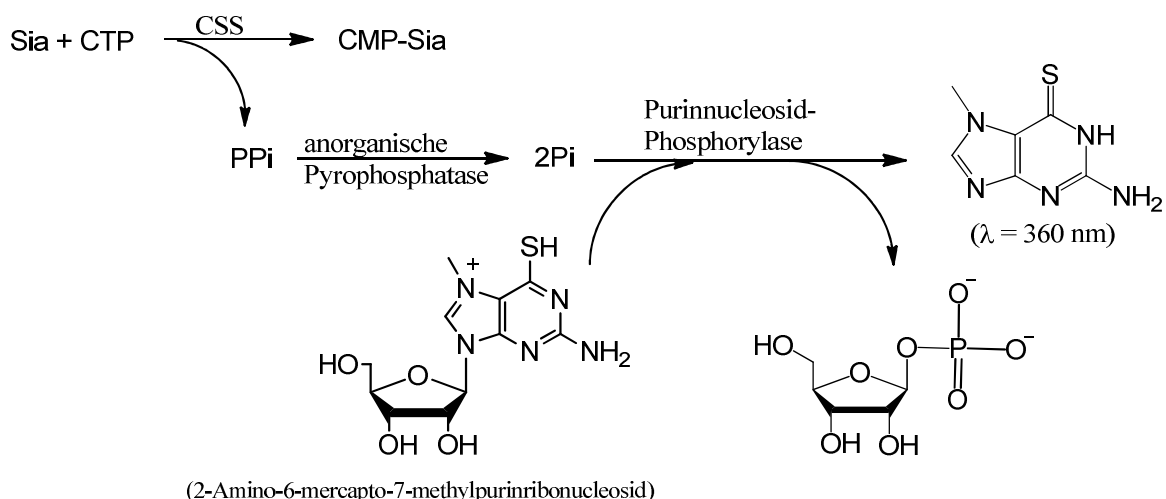


Abb. 32: Ablauf des Mercapto-methylpurin-Assays

3.2.2. Entwicklung einer neuen photometrischen Assay-Methode

Um den Reaktionsmechanismus der CSS-Aktivierung besser zu verstehen und die katalytische Bandbreite womöglich zu erweitern, ist eine schnellere und verlässlichere kontinuierliche Assaymethode für die quantitative Messung der CSS-Aktivität notwendig. Eine gute Assaymethode ist nicht nur für die Bestimmung der kinetischen Daten der verschiedenen Sialinsäuren entscheidend, sondern auch für die Messung der relativen Aktivität von Enzymmutanten.

Wie vorher beschrieben, katalysiert die CSS den Monophosphoryl-Transfer des CMP-Nucleosidanteils aus Cytidin-5'-triphosphat (CTP) auf die anomere Hydroxyl-Gruppe der Sialinsäure. Dabei wird Pyrophosphat als Nebenprodukt produziert. Da bei der Reaktion ein Proton erzeugt wird, sinkt der pH-Wert des Reaktionssystems (Abb. 33). Diese pH-Änderung kann mit Hilfe eines passenden Indikators durch eine Farbänderung photometrisch kontinuierlich verfolgt werden. Dadurch ist es möglich, eine neue Assaymethode für die CSS mittels pH-Indikation zu entwickeln. Die colorimetrische Messung unter milden Reaktionsbedingungen würde die schnelle qualitative und quantitative Bestimmung der Enzymaktivität ermöglichen.^[204, 205] Solche Assaymethoden wurden auch schon für das Screening einzelner anderer Enzymtypen, wie z.B. von Proteasen,^[206] Hydrolasen,^[207, 208] Decarboxylasen,^[209] Kinasen^[210] oder Galactosyltransferasen^[211] verwendet.

Bestimmung des Absorptionsmaximums von Kresolrot

Das Absorptionsmaximum von Kresolrot unter basischen Bedingungen wurde durch eine photometrische Messung verifiziert. Das Absorptionsspektrum von Kresolrot (Abb. 34) zeigt eine maximale Absorption im Basischen bei ca. 574 nm, wogegen im Sauren keine Absorption beobachtet wird.

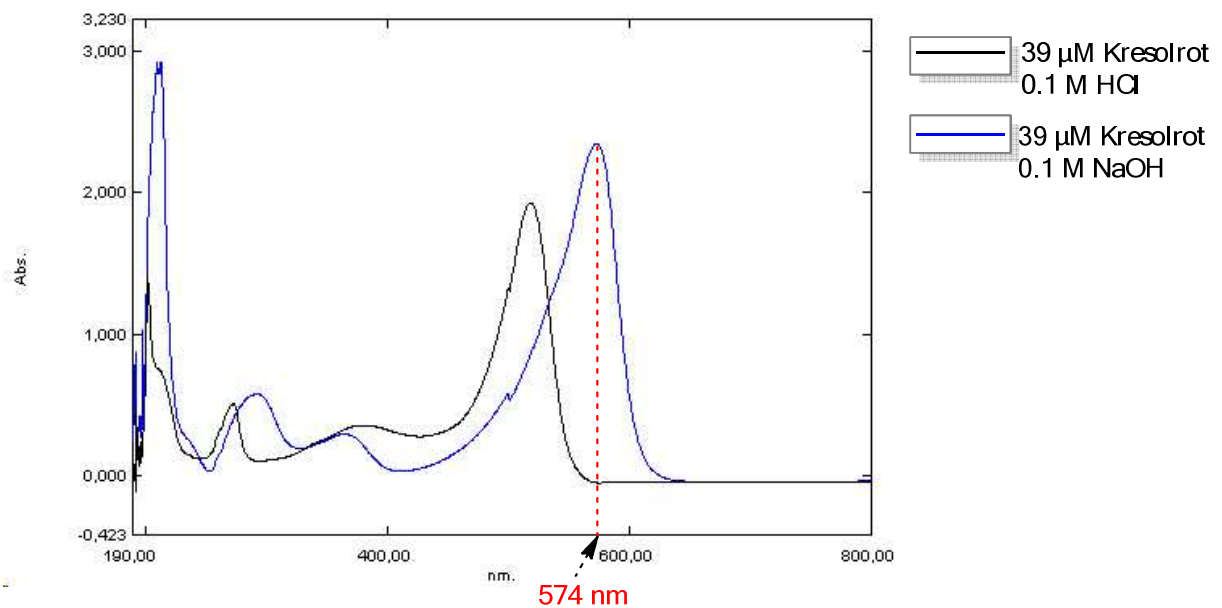


Abb. 34 Absorptionsspektrum von Kresolrot in basischer und saurer Lösung

Bestimmung der geeigneten Kresolrot Konzentration für den Assay

Für das Reaktionssystem mit pH-Indikator ist die Reaktionsgeschwindigkeit wegen des in der Reaktion beteiligten Puffers gleich der Summe der Geschwindigkeit der Bildung von protoniertem Indikator und protoniertem Puffer (Gl. 1).^[204] Wenn die pK_a -Werte von Indikator und Puffer gleich sind, ist die Verteilung der freigesetzten Protonen abhängig vom Verhältnis zwischen Puffer und Indikator (Gl. 2).^[204] Die Protonen reagieren entweder mit dem Puffer ohne Farbänderung, oder mit dem Indikator mit Farbänderung. Die höchste Empfindlichkeit erhält man bei niedrigen Pufferkonzentrationen und möglichst hohen Indikatorkonzentrationen.

$$\text{Geschwindigkeit} = \frac{\Delta[\text{Indikator} \cdot \text{H}^+]}{\text{Zeit}} + \frac{\Delta[\text{Puffer} \cdot \text{H}^+]}{\text{Zeit}} \quad (1)$$

$$\text{Geschwindigkeit} = \frac{\Delta A / dt}{\Delta \varepsilon \cdot l} \left(1 + \frac{[\text{Puffer}]}{[\text{Indikator}]} \right) \quad (2)$$

ΔA : Absorptionsänderung

dt : Zeitänderung

$\Delta \varepsilon$: Absorptionskoeffizient

l : Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

Zur Bestimmung der optimalen Indikatorkonzentration für den pH-Assay wurden Messungen mit verschiedenen Konzentrationen von Kresolrot durchgeführt. Jeder Messpunkt ist ein Durchschnittswert aus 5-10 Messungen (Abb. 35a). Das Diagramm zeigt, dass die Absorption linear steigt, wenn die Konzentration von Kresolrot von 0.002 bis 0.040 mM zunimmt (Abb. 35b). Bei höheren Konzentrationen nähert man sich der Grenze des instrumentell erfassbaren Messbereichs. Wenn die Absorption im Konzentrationsbereich von 0.013 mM bis 0.026 mM linear gefittet wird, erhält man im Vergleich zur Abb. 35b eine Gerade mit einem exzellenten R-Wert (Abb. 35c). Die höchste Konzentration von Kresolrot in diesem Bereich, d.h. 0.026mM, wurde für den pH-Assay ausgewählt, nachdem bestätigt war, dass es bei dieser Konzentration zu keinen inhibitorischen Effekten für die CSS-Aktivität kommt.

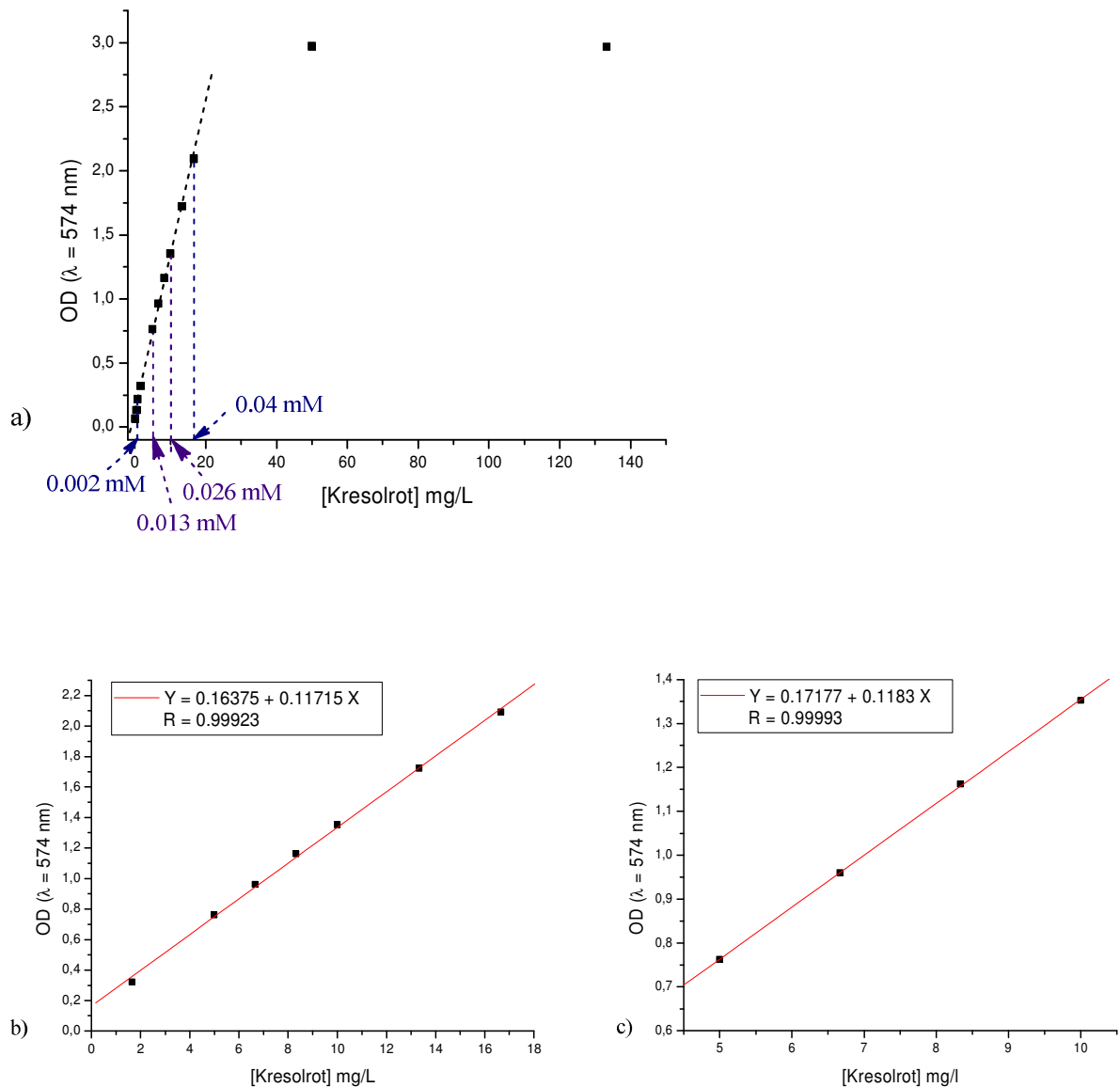


Abb. 35: Einfluss verschiedener Kresolrotkonzentrationen auf den pH-Assay. a) Absorptionsmessdaten mit verschiedenen Kresolrot-Konzentrationen; b) Linearer Fit für die Kresolrotkonzentration von 1.665 ~ 16.665 mg/L; c) Linearer Fit für die Kresolrotkonzentration von 1.665 ~ 16.665 mg/L.

Bestimmung der Eichgerade

Der Zusammenhang zwischen der Menge der produzierten Protonen und der Absorption des Indikators wurde durch Zugabe von HCl zur Reaktionsmischung ohne CTP bestimmt. Die Kalibrierkurve (Abb. 36) wurde bei 574 nm mit einem Protonen-Konzentrationsbereich von 0 bis 1.3 mM aufgenommen. Die Konzentration der während der CSS-Aktivierung produzierten Protonen wird von diesem Konzentrationsbereich abgedeckt.

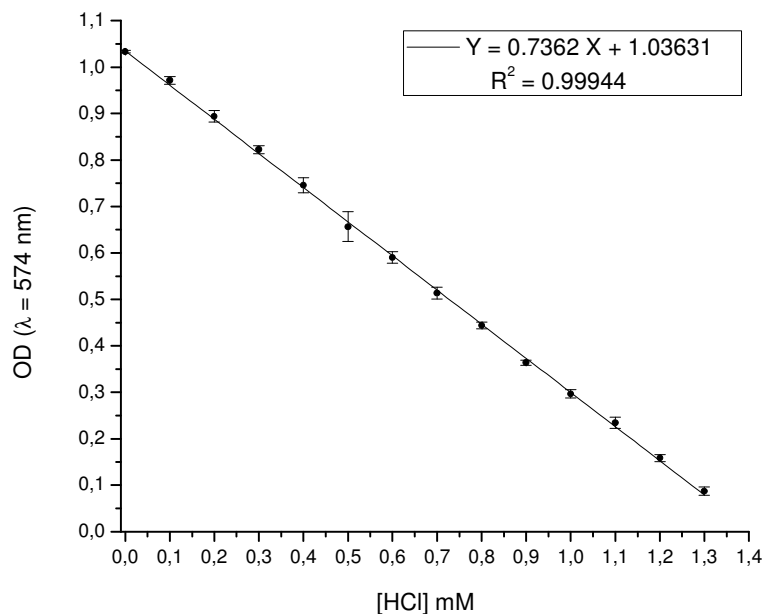


Abb. 36: Kalibrierungskurve für den CSS Assay. Messbedingungen: 2 mM Neu5Ac, 0.026 mM Kresolrot, 10 mM MgCl_2 , 1.2 μg CSS in 2 mM Tris-Puffer, $T = 37^\circ\text{C}$, $[\text{HCl}]$: 0 ~ 1.3 mM.

Die Absorptionsänderung wurde unter Reaktionsbedingungen mit fast gesättigter Substratkonzentration gemessen. Als Negativkontrolle wurde die Messung unter gleichen Reaktionsbedingungen ohne Neu5Ac durchgeführt (Abb. 37). Mit Hilfe der Kalibrierkurve kann die Beziehung zwischen Zeit und Konzentration von freigesetzten Protonen nach der Gleichung 3 ($OD_{\lambda=574\text{ nm}}$: Absorptionsdaten bei 547 nm, t : Zeit) bestimmt werden (Abb. 38). Die spezifische Enzymaktivität wurde dann nach der Gleichung 4 (a : Geschwindigkeit der produzierten Protonen pro min, f : Verdünnungsfaktor, V : gesamte Volumen) kalkuliert und ergab einen Wert von 60.9 U mg^{-1} . Dies ist gut vergleichbar mit dem Wert von 97 U/mg , den *M. Knorst*^[104] unter der Verwendung der diskontinuierlichen Phosphat-Assay-Methode für dieselbe CSS bestimmt hatte, die nach derselben Methode produziert und aufgereinigt worden war. In unserer Assay-Methode ist ein Unit CSS-Aktivität definiert als die Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 μmol Protonen in einer Minute aus der Reaktion mit CTP und Neu5Ac unter den oben beschriebenen Assay-Bedingungen freizusetzen.

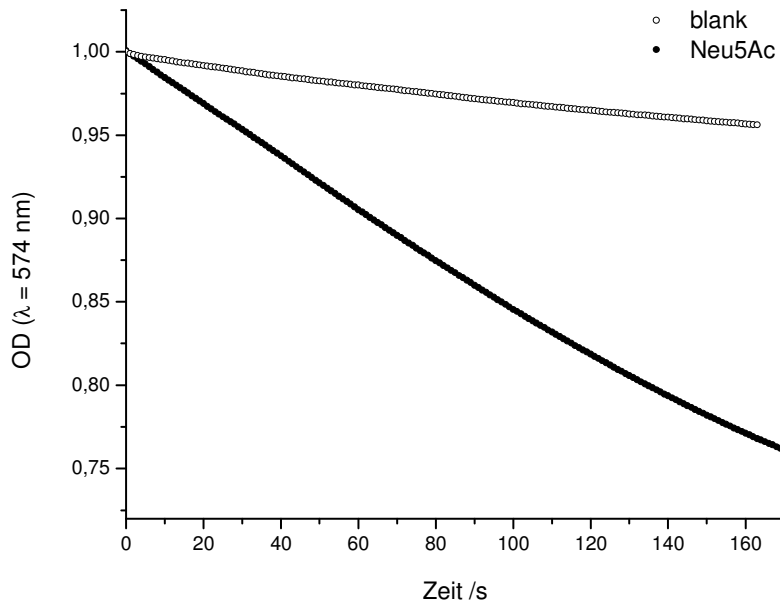


Abb. 37: Bestimmung der CSS Aktivität. Reaktionsbedingungen: 2 mM Neu5Ac, 0.026 mM Kresolrot, 10 mM MgCl₂, 1.2 µg CSS in 2 mM Tris-Puffer, Messung wird nach der Zugabe von 0.5 mM CTP begonnen; Blank: gleiche Reaktionsbedingungen aber ohne Neu5Ac.

$$\begin{aligned}
 OD_{\lambda=574 \text{ nm}} &= A + B [H^+] && \xrightarrow{\text{differential zu Zeit}} && \frac{d(OD_{\lambda=574 \text{ nm}})}{dt} = B \frac{d[H^+]}{dt} \\
 \frac{d[H^+]}{dt} &= \frac{1}{B} \cdot \frac{d(OD_{\lambda=574 \text{ nm}})}{dt} && && (3)
 \end{aligned}$$

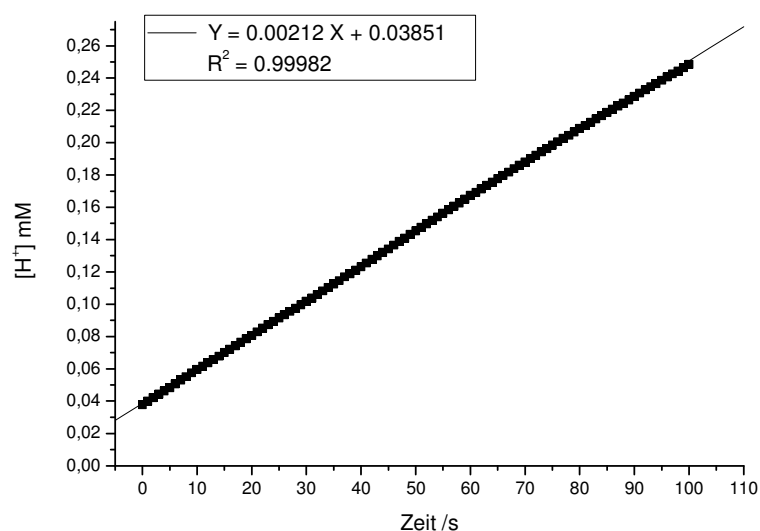


Abb. 38: Linearität des CSS-Assays (Beziehung zwischen der produzierten Proton-Konzentration und der Reaktionszeit).

$$\begin{aligned}
 A &= \frac{a \cdot V_{\text{gesamt}} \cdot f}{V_{\text{enzyme}}} = \frac{0.00212 \cdot 10^3 \mu\text{M/s} \cdot (0.6 \cdot 10^{-3}) \text{ L} \cdot 1}{6 \cdot 10^{-3} \text{ mL}} \\
 &= 0.212 (\mu\text{mol/s}) \cdot \text{mL}^{-1} \\
 &= 12.72 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}
 \end{aligned} \tag{4}$$

Bestimmung der optimalen Konzentration des Kofaktors Mg^{2+}

Für die CSS-Aktivierungsreaktion wird Mg^{2+} als wichtiger Kofaktor benötigt.^[87] Deswegen war die Bestimmung der optimalen MgCl_2 -Konzentration für den CSS-pH-Assay notwendig. Die Messung wurde unter Variation der Endkonzentration an Mg^{2+} durchgeführt. Die maximale CSS-Aktivität wird bei einer Mg^{2+} -Konzentration von ca. 10 mM (Abb. 39) erreicht, was mit dem Literaturwert von ca. 10 ~ 15 mM^[87] gut übereinstimmt, der mit dem TBA-Assay detektiert wurde.

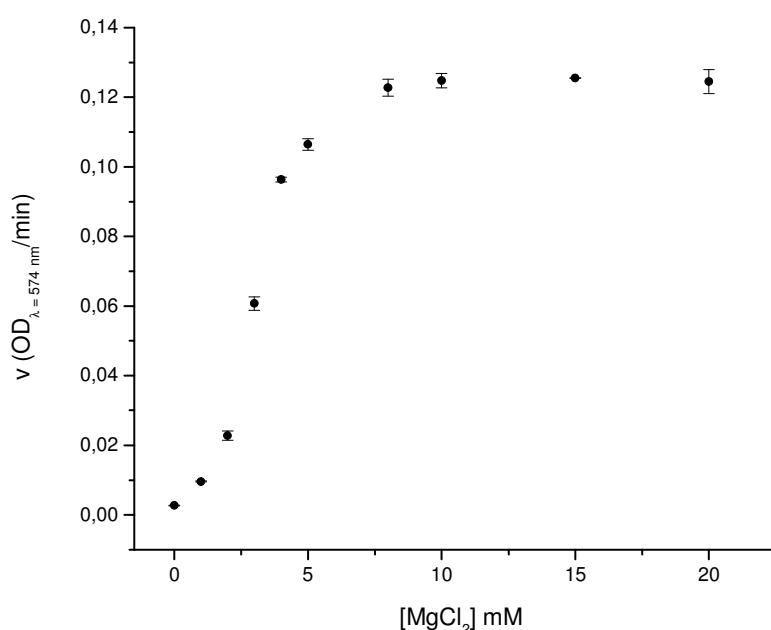


Abb. 39: Die Messungen der Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Konzentrationen von Mg^{2+} . Reaktionsbedingung: 3 mM Neu5Ac, 5 mM CTP, 0.026 mM Kresolrot, $[\text{MgCl}_2]$: variiert, 1.2 μg CSS in 2 mM Tris-Puffer.

Quantifizierung des Substrats CTP für CSS-Assay

CTP ist das elektrophile Standard-Substrat in der CSS-katalysierten Aktivierungsreaktion, und kann nicht durch ATP, UTP oder GTP ersetzt werden.^[87] CTP ist ein in Wasser stark dissoziiertes Substrat und hat deswegen Puffer-Funktion in der Lösung, was inkompatibel mit dem pH-Assay-Prinzip ist. Jedoch kann aufgrund der hohen Affinität der CSS für CTP und den daher nur sehr geringen benötigten Konzentrationen an CTP, diese Pufferfunktion vernachlässigt werden, wodurch die quantitative kinetische Messung für CTP mit nur kleinem Fehler durch die pH-Assay-Methode analysiert werden kann. Durch die kontinuierliche pH-Assay-Methode wurden die kinetischen Daten (K_M und k_{cat}) für CTP unter der Verwendung von fixierter Neu5Ac-Konzentration von 3.0 mM gemessen, und durch *Michaelis-Menten*-Analyse (Abb. 40) bestimmt. Im Vergleich zu den bisher publizierten K_M -Werten, 0.31 mM,^[200] 0.17 mM^[104] und 0.56 mM,^[87] die durch nicht kontinuierliche Assay-Methoden bestimmt wurden, ist der K_M -Wert von $54 \pm 8 \mu\text{M}$ für CTP mit dem pH-Assay ca. 10-fach kleiner. Allerdings ist er vergleichbar mit dem kürzlich publizierten Wert von $34 \pm 5 \mu\text{M}$, der durch eine andere kontinuierliche Assay-Methode bestimmt wurde.^[203] Der k_{cat} -Wert für CTP liegt

bei $18.6 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$ und die Katalyse-Effektivität k_{cat}/K_M ist $344.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Außerdem wurde ein inhibitorischer Effekt beobachtet, wenn die CTP-Konzentration höher als 0.5 mM beträgt. Ein möglicher Grund dafür ist neben einer allosterischen Inhibition, dass CTP bei hoher Konzentration in der Reaktion einen Puffer-Effekt bewirkt.

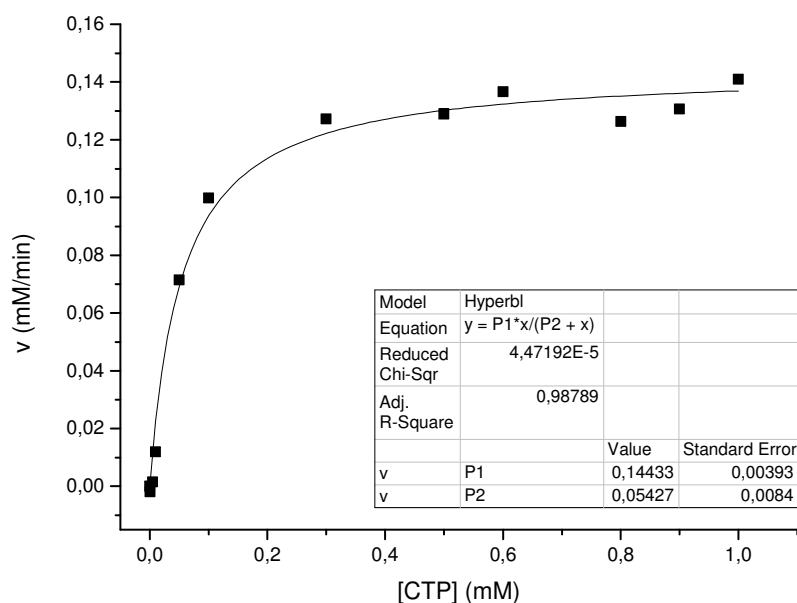


Abb. 40: Bestimmung der CSS-Kinetik für CTP mittels der pH-Assay-Methode mit Daten-Analyse nach der *Michaelis-Menten*-Gleichung (Origin 8.5 Programm). Reaktionsbedingungen: 3 mM Neu5Ac, 0.026 mM Kresolrot, 10 mM MgCl_2 , 2.1 μg CSS in 2 mM Tris-Puffer; nach der Zugabe von CTP in variabler Konzentration beginnt die Messung.

3.2.3. Kinetische Bestimmung der Substrattoleranz der CSS mit Neu5Ac und verschiedenen Substratanaloga

Neu5Ac (**160**) ist das natürliche Substrat der CSS. Für kinetische Untersuchungen durch die pH-Assay-Methode wurde die CTP-Konzentration auf 0.5 mM fixiert, weil dies im Prinzip bei nahezu gesättigter Substratkonzentration die maximale Reaktionsgeschwindigkeit sichert (Tabelle 6).^[214] Die Konzentration von Neu5Ac wurde variiert.

Tabelle 6: Relativer Sättigungsgrad (% von V_{\max})

Substrat-Überschuss (x-fach K_M)	% V_{\max}
1	50
5	83.3
10	90.9
50	98.0
1000	99.9
∞	100.0

Die Daten-Analyse nach *Michaelis-Menten*-Gleichung (Abb. 41) ergab einen K_M (Neu5Ac)-Wert von $110 \pm 10 \mu\text{M}$, der fast identisch ist mit dem kürzlich publizierten K_M -Wert von $130 \mu\text{M} \pm 9$, der durch eine andere kontinuierliche Methode bestimmt wurde.^[203] Im Vergleich mit einem durch den diskontinuierlichen Phosphat-Assay bestimmten K_M -Wert von 0.43 mM ist der neu bestimmte Wert ca. vierfach kleiner.^[104] Der k_{cat} -Wert für Neu5Ac, das natürliche Substrat der CSS, und die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M liegen bei $18.6 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ und $169.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

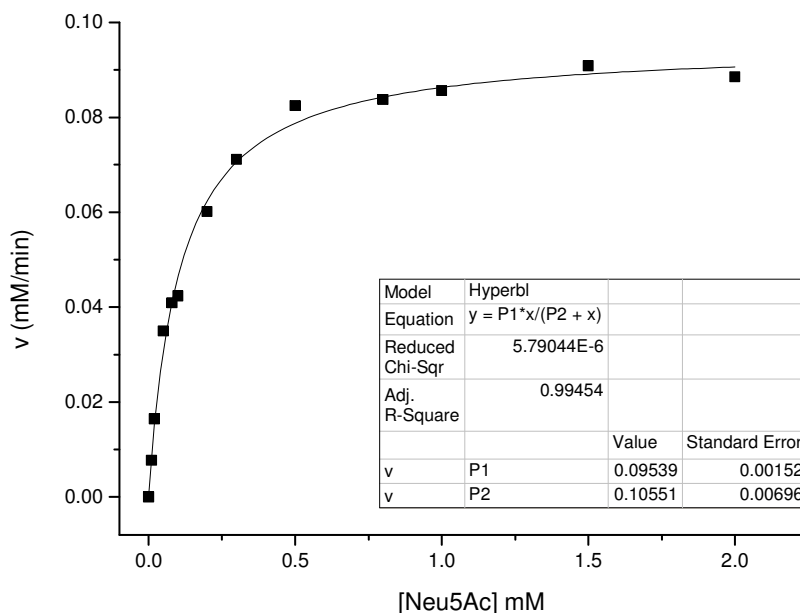


Abb. 41: Bestimmung der CSS-Kinetik für Neu5Ac mittels der pH-Assay-Methode mit Daten-Analyse nach der *Michaelis-Menten*-Gleichung (Origin 8.5 Programm). Reaktionsbedingungen: [Neu5Ac]: variiert, 0.5 mM CTP, 0.026 mM Kresolrot, 10 mM MgCl_2 , 1.4 μg CSS in 2 mM Tris-Puffer.

Um die Bindungsaffinität der CSS für spezifische Substratanaloga zu bestimmen und die strukturellen Voraussetzungen für die hohe Substrattoleranz der CSS genauer zu klären als bislang möglich, wurden die kinetischen Parameter, K_M und k_{cat} , durch den neu entwickelten pH-Assay für verschiedene Substratvarianten bestimmt, die durch systematische strukturelle Veränderungen des natürlichen Substrats Neu5Ac erreichbar sind (Abb. 42). Die Auswahl enthält terminal modifizierte Substrate, wie z.B. die 9-Azid-substituierten Neu5Ac-Derivate (**162**)^[110, 126] sowie zwei verkürzte Neu5Ac-Derivate mit Kettenlängen von C₈ (**163**) und C₇ (**168**). Die Bedeutung des C5-Amid-Restes wurde in Form der 5-desaminierten Analoga, KDN (**169**) und ihrem 5-Epimer (**170**), bzw. den Sialinsäuren mit variierten 5-*N*-Acyl-Ketten, wie z.B. der *N*-Glycolyl- (**171**), *N*-Azidoacetyl- (**172**)^[126] und der *N*-Hexinoyl-Gruppe (**173**), sowie mit den Aromaten-modifizierten *N*-Acyl-Gruppen, wie *N*-Phenylacetyl (**174**) und *N*-Benzoyl (**175**)^[174, 176] mit Hilfe des neuen Assay evaluiert. Außerdem wurde daneben eine Verbindung mit Sulfonamidgruppe (**176**) statt des Carbonsäureamids in dieser Substrat-Liste berücksichtigt. Mit Ausnahme von **170** (epi-KDN) wurden die Synthesen aller hier verwendeten Substrate bereits im Abschnitt 3.1 beschrieben, diese ähnlich wie die Synthese von **171-176** auch durch NeuA-Katalyse aus D-Glucose hergestellt werden kann.^[180]

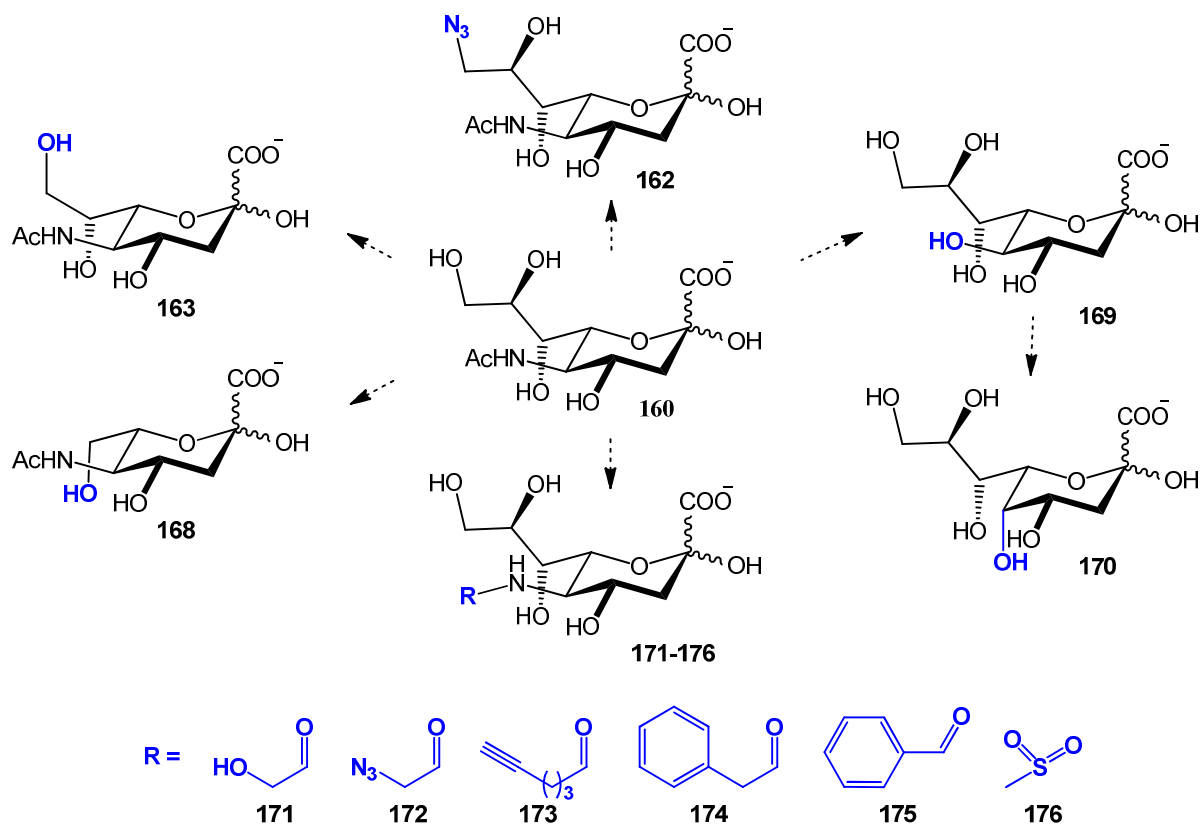


Abb. 42: systematische Struktur-Variation von Neu5Ac.

Alle elf Neu5Ac-Analoga wurden als mögliche Substrate der CSS durch den photometrischen pH-Assay unter denselben Reaktionsbedingungen wie für Neu5Ac untersucht. Für die schlechteren Substrate mit niedrigen Umsatzgeschwindigkeiten wurde die CSS-Enzym-Menge erhöht, um praktikable Messungen zu ermöglichen. Die kinetischen Untersuchungen weisen nach, dass alle Verbindungen als Substrate der CSS dienen können. Dies steht im Einklang mit der von *M. Knorst* im Arbeitskreis gemachten Entdeckung der ungewöhnlich breiten Substrat-Toleranz^[104] dieses Enzyms. Interessanterweise erwiesen sich alle Beispiele als im Assay-System mit guter Reproduzierbarkeit quantifizierbar, obwohl die strukturellen Variationen des natürlichen Substrats zum Teil gravierend sind, wie z.B. im Falle der sterisch anspruchsvollen *N*-Acyl-Reste oder der stereochemischen Inversion an der kritischen C5-Position.

Tabelle 7: Kinetische Parameter^{a)} für verschiedene CSS-Substraten.

Nr.	Substrat	K_M (mM)	V_{\max} (mM/min)	$[CSS]_{\text{end}}$ (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
160	Neu5Ac	0.11±0.01	0.095±0.002	8.50E-05	18.6±0.4	169.1
162	Neu5Ac-9N ₃	0.16±0.02	0.083±0.002	2.44E-04	5.67±0.14	35.4
163	C8-Neu5Ac	0.17±0.01	0.03±0.001	9.76E-05	5.12±0.07	30.1
168	C7-Neu5Ac	0.16±0.01	0.03±0.001	1.63E-03	0.29±0.01	1.81
169	KDN	36.1±3.3	0.12±0.01	4.88E-04	4.10±0.17	0.11
170	epi-KDN	2.63±0.18	0.01±0.001	1.63E-03	0.13±0.01	0.05
171	Neu5Gc	2.02±0.48	0.07±0.01	2.44E-04	4.85±0.34	2.40
172	Neu5AcN ₃	1.33±0.06	0.31±0.01	7.74E-05	67.8±1.5	51.0
173	Neu5Hex	17.7±1.9	0.17±0.01	2.44E-04	11.8±0.6	0.67
174	Neu5PhAc	10.4±1.2	0.048±0.002	4.64E-04	1.72±0.07	0.17
175	Neu5Bz	6.02±0.94	0.017±0.001	8.13E-04	0.89±0.06	0.15
176	Neu5Ms	0.46±0.04	0.24±0.01	4.88E-04	8.20±0.31	17.8

^{a)} Die Daten wurden mit fixierter CTP-Konzentration von 0.5 mM und variierenden Konzentrationen von verschiedenen Substraten durch die pH-Assay-Methode gemessen und mittels *Michaelis-Menten*-Gleichung analysiert.

In der Tabelle 7 sind die kinetischen Parameter K_M , k_{cat} und k_{cat}/K_M für die verschiedenen Substrate zusammengefasst. Hinsichtlich der kinetischen Daten können die Substrate

entsprechend der Substrat-Affinität (K_M), katalytischen Geschwindigkeit (k_{cat}) und katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) in 3 Gruppen eingeteilt werden. Nur die Substrate ohne modifizierten NHAc-Rest (**160**, **162**, **163** und **168**) zeigen die höchsten Bindungsaffinitäten, während die Strukturen ohne Amid (**169**) oder mit großen *N*-Acyl-Gruppen (**173-175**) eine Reduzierung der Affinität um mehr als einer Größenordnung verursachen. Für Substrate mit anderen Acyl-Resten werden die Affinitäten weniger stark reduziert.

Die katalytischen Effizienzdaten offenbaren Folgendes:

- 1) Im Vergleich zum natürlichen Substrat Neu5Ac erlaubt die verkürzte Sialinsäure, C7-Neu5Ac (**168**) nur noch 1% Effizienz, C8-Neu5Ac (**163**) aber immerhin 18%.
- 2) Die beiden Azid-modifizierten Derivate, **162** (im Terminus) und **172** (im Acyl-Rest) sind aktivierbare Substanzen mit ähnlich guter katalytischer Effizienz.
- 3) Die beiden desaminierten Analoga mit einer C5-OH-Gruppe haben die niedrigste Effizienz, jedoch aus unterschiedlichen Gründen. KDN (**169**) zeigt eine geringe Affinität, aber gute Katalyse-Geschwindigkeit. Das 5-Epimer **170** zeigt zwar gute Affinität, aber sehr niedrige Geschwindigkeit.
- 4) Die niedrigere Affinität für **173** mit langem *N*-Acyl-Rest steht im Gegensatz zu der hohen Katalyse-Geschwindigkeit.

Vergleichen wir die CSS-Kinetikparameter, K_M - bzw. k_{cat}/K_M -Daten, aller Substrate in der Tabelle 7, so überspannt der Kinetikdaten-Bereich insgesamt mehr als zwei (1:300) bzw. drei (1:3000) Größenordnungen, deswegen scheint diese Assay-Methode sehr empfindlich für die schnelle Bestimmung der CSS-Substrat-Qualität gut geeignet zu sein.

Interpretation der CSS-Bindungswechselwirkungen mit Neu5Ac und deren Derivaten

Um die Bedeutung der kinetischen Daten für die Bindungswechselwirkung zwischen der CSS und unterschiedlichen Substraten verstehen zu können, benötigt man die Kristallstruktur-Daten der CSS. Die Röntgen-Proteinkristallstruktur der homodimeren CSS aus *Neisseria meningitidis* (NmCSS) (Abb. 43) war in Gegenwart des Substratanaloga CDP gelöst und in dieser die Sialat-Bindungstasche identifiziert worden (PDB entry 1EYR).^[108] Der direkte Kontakt von CSS-Aminosäure-Resten des aktiven Zentrums mit der Sialinsäureeinheit im

aktivierten Produkt kann aus der entsprechenden Röntgenkristallstruktur der tetrameren Maus-CSS (Abb. 44) in Gegenwart des Liganden CMP-Neu5Ac (PDB entry 1QWJ)^[107] abgeleitet werden, da die entscheidenden Aminosäure-Reste, die an der Bindung des Zuckers beteiligt sind, hoch konserviert sind. Die strukturelle Ausrichtung der beiden Protein-aktiven Zentren, besonders der Mononucleotid-Portion von beiden im Protein gebundenen Substraten zeigt, dass die Substrate in beiden CSS-Enzymen in sehr ähnlicher Position und Orientierung gebunden werden (Abb. 45).^[203]

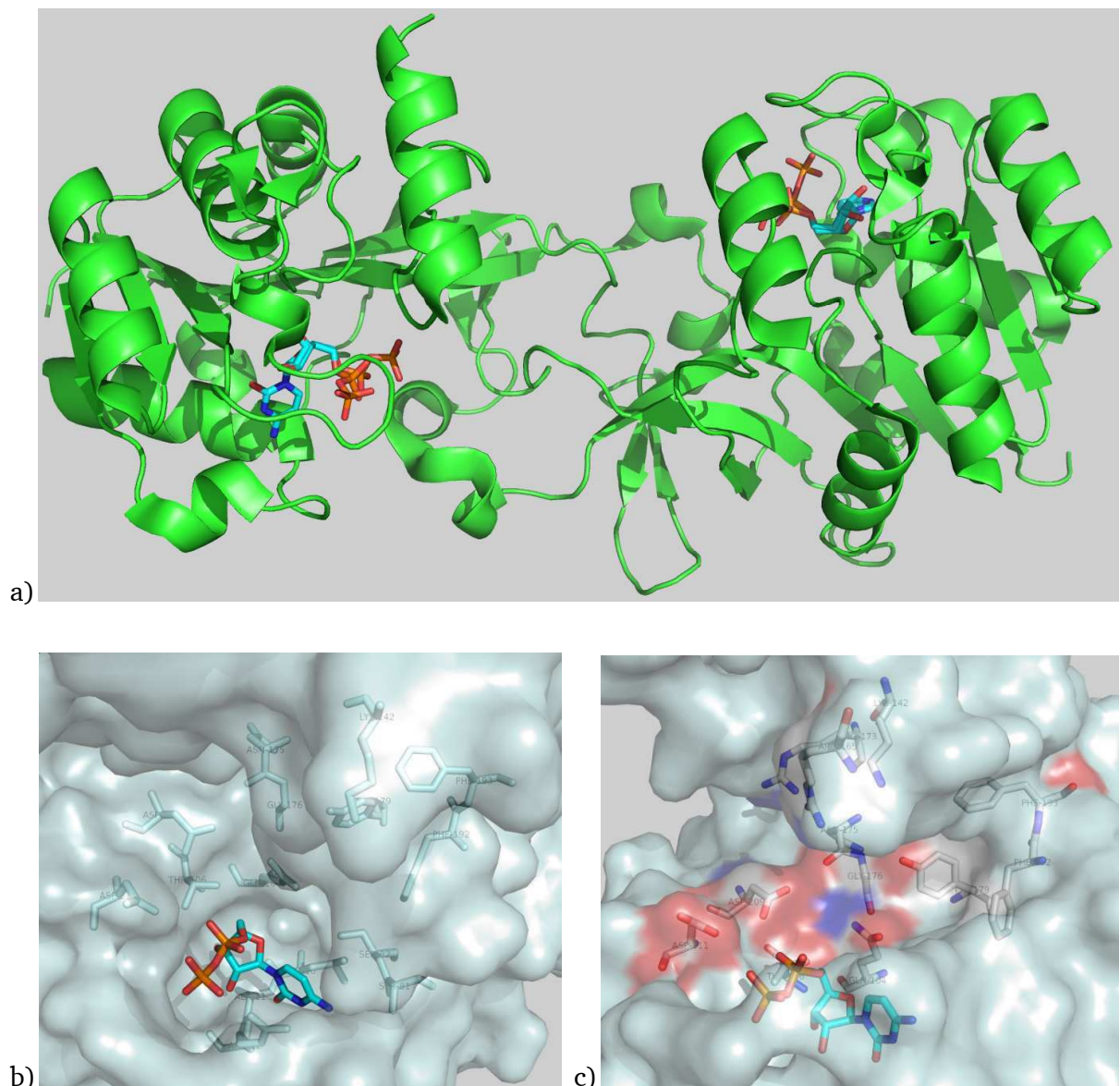


Abb. 43: a) Kristallstruktur der dimeren CSS aus *Neisseria meningitidis* einschließlich des co-kristallisierten Liganden CDP (PDB Entry 1EYR^[108]); b) und c) aktives Zentrum der NmCSS-Kristallstruktur. Blaue Struktur: CDP, weiße Strukturen: Aminosäurereste im aktiven Zentrum.

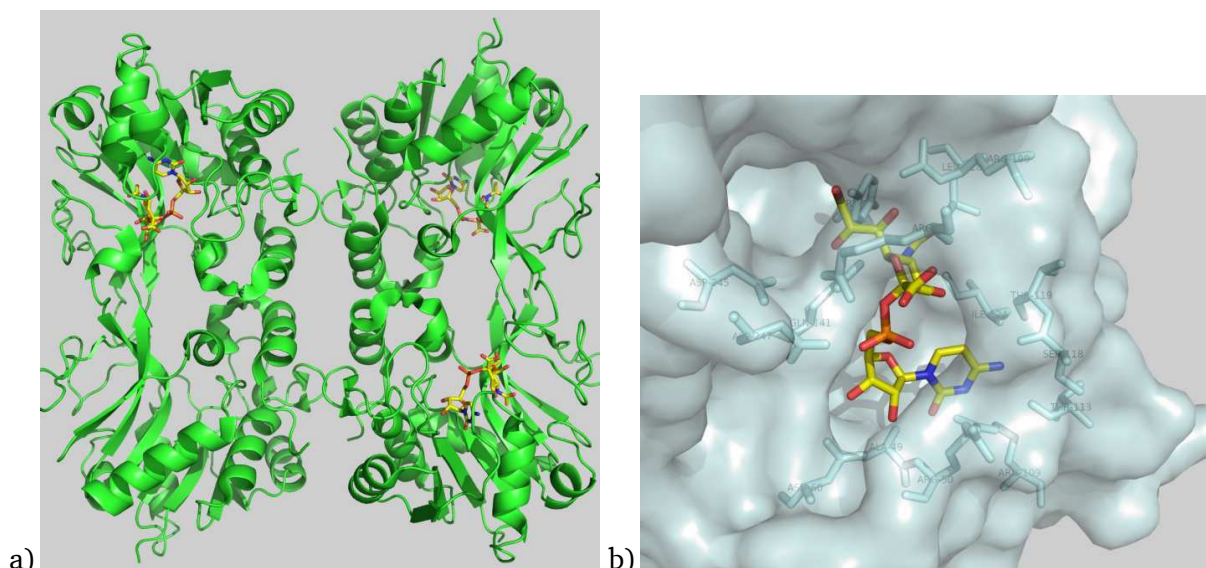


Abb. 44: a) Kristallstruktur der tetrameren Maus-CSS (PDB entry 1QWJ^[107]); b) aktives Zentrum der Maus-CSS. Gelbe Struktur: CMP-Neu5Ac, weiße Strukturen: Aminosäurereste im aktiven Zentrum.

Für die Erklärung der Wechselwirkungen zwischen einem Substrat wie z.B. Neu5Ac und dem aktiven Zentrum der NmCSS ist die NmCSS-Röntgenkristallstruktur mit Neu5Ac als Ligand nötig. Leider enthält die publizierte NmCSS-Kristallstruktur (PDB entry 1EYR)^[108] nur CDP als Ligand. Eine Kristallisation der NmCSS mit dem Substrat Neu5Ac als Ligand ist wegen der Abhängigkeit von vielen verschiedenen Parametern, wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Enzymreinheit, Enzymkonzentration bzw. Fällungsmittelkonzentration, ausgesprochen aufwändig. Eine Alternative böte die Überlagerung der vorhandenen NmCSS-Kristallstruktur mit einer funktionell ähnlichen CSS-Struktur, die Neu5Ac oder besser noch CMP-Neu5Ac als Ligand besitzt.

Die bekannte Maus-CSS-Kristallstruktur (PDB entry 1QWJ)^[107] enthält tatsächlich das aktivierte Produkt CMP-Neu5Ac als Ligand. In der Mutagenese-Studie^[203] der Arbeitsgruppe Berry wurden die Aminosäuresequenzen von MausCSS und NmCSS verglichen und die beiden Kristallstrukturen wurden mit Hilfe des *PyMol*-Programms überlagert. Mit Hilfe der strukturellen Überlagerung des aktiven Zentrums der NmCSS mit CDP als Ligand mit dem aktiven Zentrum der MausCSS mit dem Ligand CMP-Neu5Ac wurden 9 Reste (Gln104, Lys142, Arg173, Asn175, Tyr179, Phe192, Phe193, Asp209 und Asp211) als vermutlich wichtige Aminosäurereste für die Bindung mit Neu5Ac vorgeschlagen und durch eine Mutagenese-Studie (Alanin-Scan) bestätigt. Die Überlagerung beider CSS-Strukturen erwies sich als gute Methode für die Erklärung der kinetischen Daten des NmCSS-Wildtyps und dessen Mutanten.

Um ein vergleichbares überlagertes CSS-Strukturmodell für eigene Studien zu erhalten, wurde ebenfalls mit dem Programm *PyMol* ein 3D-Alignment versucht. In *PyMol* wurde zuerst die NmCSS-Kristallstruktur (PDB entry 1EYR) mit CDP als Ligand eingesetzt, dem die MausCSS grob überlagert wurde. Für ein verfeinertes Strukturmodell wurden dann ausgewählte Aminosäuren des aktiven Zentrums der NmCSS mit funktionsidentischen Aminosäuren der MausCSS sowie der beiden Nucleotidanteile gebundener Liganden gerichtet nochmals überlagert. Nach Entfernen des CDP-Liganden und der MausCSS verblieb die NmCSS-Struktur mit CMP-Neu5Ac in plausibler Bindungskonformation, um die Wechselwirkungen zwischen NmCSS und Neu5Ac näher analysieren zu können.

Die simulierte Substratstruktur von CMP-Neu5Ac plus CDP im überlagerten Struktur-Modell (Abb. 45) aus NmCSS und MausCSS-Ligand passt qualitativ sehr gut zu dem angenommenen Reaktionsmechanismus, nach dem das freie anomere O-Atom der Sialinsäure als Nucleophil die α -Phosphat-Einheit von CTP mit einer Inversion der Phosphat-Konfiguration angreift (Abb. 45b),^[94, 203] was dem *induced fit*-Modell^[215] entspricht. Dieser Aspekt validiert das erzeugte Strukturmodell, da offensichtlich über den Nucleotidanteil CMP hinaus die Orientierung des Zuckers um das anomere Zentrum korrekt ist. Die Aminosäuren Asp209/Asp211 in der CSS wurden vor Kurzem durch Punktmutagenese als für die Bindung von Mg^{2+} -Ionen (als Kofaktor) wichtige Aminosäuren identifiziert (Abb. 46a).^[203] Das überlagerte Struktur-Modell aus NmCSS mit dem Liganden CMP-Neu5Ac in der Konformation des Maus-Komplexes wurde im Folgenden für die weitergehende Analyse möglicher Ursachen für die kinetischen Unterschiede von Neu5Ac-Substratanaloga verwendet.

Die spezifischen Wechselwirkungen der Bindung zwischen MausCSS-/NmCSS-Resten und dem Substrat Neu5Ac wurden bereits nach der Analyse der Röntgenkristallstrukturen von MausCSS (im Komplex mit CMP-Neu5Ac) und der NmCSS-Kristallstruktur (CDP als Ligand) bzw. der Analyse der überlagerten Strukturen der NmCSS mit der MausCSS mit Hilfe der NmCSS-Mutagenese-Studie identifiziert,^[107, 108, 203] was in der Tabelle 8 zusammengefasst wird. Die Identifizierung spezifischer Kontakte zwischen NmCSS und CMP-Neu5Ac anhand der Maus-CSS-Struktur ist dadurch erschwert, dass die beiden Strukturen in unterschiedlicher Form kristallisiert wurden. Die NmCSS besitzt eine Konformation, die durch eine geöffnete Substrattasche für den Eintritt von Neu5Ac charakterisiert ist,^[108] wogegen die Maus-CSS eine signifikante Veränderung dadurch aufweist, dass durch Bindung des Substrats CMP-Neu5Ac eine entsprechende geschlossene Konformation des Enzyms erzeugt wurde.^[107] Zum Beispiel ist die für die Katalyse benötigte Aminosäure Arg165 in der NmCSS, die der Aminosäure Arg202 in der Maus-CSS entspricht, mit mehr als 5 Å entgegen der Richtung der Substrat-

Bindung (Salzbrücke zu Neu5Ac Carboxylat-Ion) transloziert.^[107] Außerdem ist die NmCSS ein dimeres Enzym (Abb. 43a), dessen aktives Zentrum an der Grenzfläche zwischen den beiden Proteineinheiten lokalisiert ist, und aus den Resten beider Proteineinheiten gebildet wird, was die dynamische Flexibilität deutlich vergrößert. Daraus resultiert eine zunehmende Unklarheit für die Zuordnung solcher Aminosäurereste zur Substratbindung, die weiter von der hoch geordneten Nucleotid-Bindungstasche entfernt sind. (Abb. 43c).

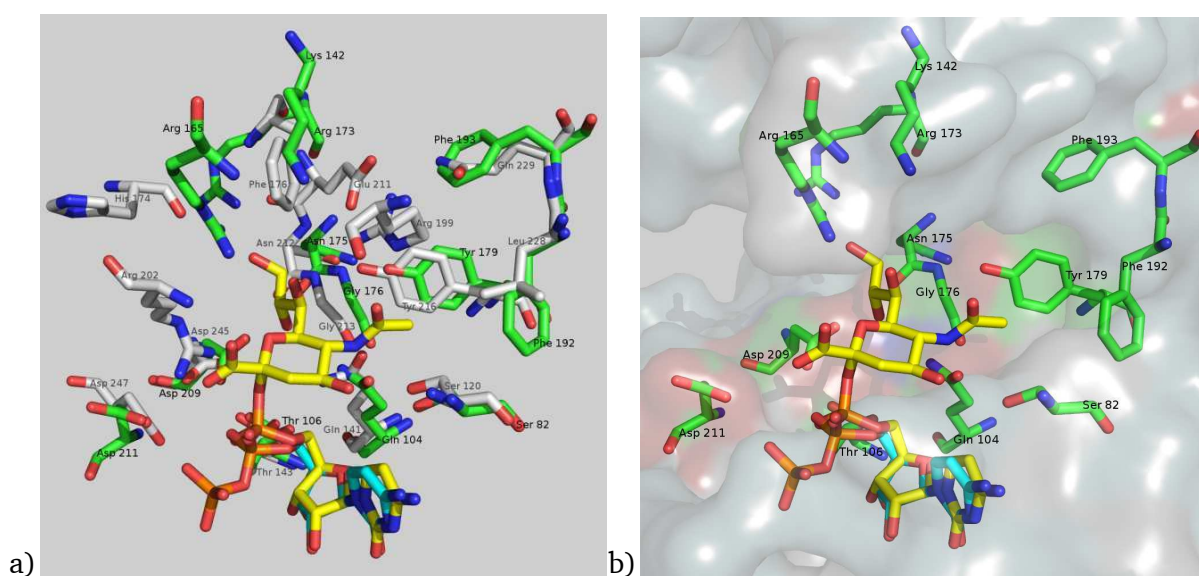


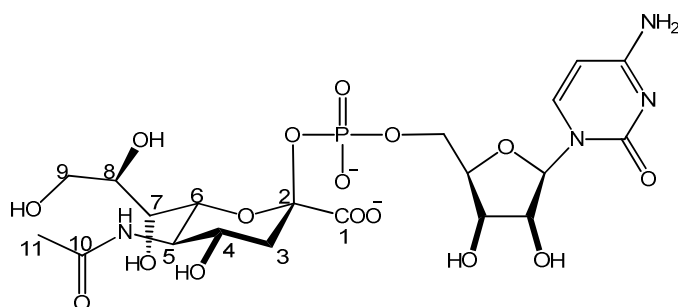
Abb. 45: a) Struktur-Überlagerung von CSS aus *Neisseria meningitidis* inklusive CDP (PDB Entry 1EYR,^[108] Aminosäuren im aktiven Zentrum werden in grün gezeigt, CDP in blau) mit Maus-CSS, inklusive Ligand CMP-Neu5Ac (PDB Entry 1QWJ;^[107] Aminosäuren im aktiven Zentrum werden in grau gezeigt, CMP-Neu5Ac in Gelb); b) Bindungsmodell für NmCSS, in dem die Überlagerung von CDP (blau) und CMP-Neu5Ac (gelb) gezeigt wird, beleuchtet die Inversion der Konfiguration des Phosphats während der Katalyse.

Dieses gut überlagerte 3D-CSS-Strukturmodell (Abb. 45) wird mit Hilfe des *PyMol*-Programms bezüglich der Wechselwirkungen zwischen dem Substrat (CMP-Neu5Ac) und dem aktiven Zentrum der NmCSS analysiert. Die möglichen spezifischen Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten in der NmCSS und dem Substrat CMP-Neu5Ac bzw. die korrespondierenden, sicher identifizierten Kontakte aus der MausCSS-Struktur sind in der Tabelle 8 gegenübergestellt. Für die Analyse von strukturellen Beiträgen der Neu5Ac-Analoga können zunächst die Wechselwirkungen von Strukturinkrementen in die des polaren „Glycerol“-Rests und denen der weniger polaren Acetamid- und Ring-Substitutionen aufgeteilt

werden. Die kinetischen Daten der verkürzten Sialinsäuren C8/C7-Neu5Ac (**163/168**) zeigen uns, dass die verkleinerten Polyolketten keine beträchtliche Auswirkung auf die CSS-Affinität haben. Sie verursachen jedoch eine deutliche Abnahme von k_{cat} mit mehr als einer Größenordnung für C7-Neu5Ac (**168**). Gln104 wird in einer Brückenposition über eine Hydrogen-Bindung mit dem Amid-NH und C8-OH Substitution gebunden. Vermutlich verursacht daher die Abwesenheit der letzten OH-Gruppe in **168** die Veränderung der Konformation der Gln104-Seitenkette, wodurch die nucleophile Aktivierung an der C2-OH-Position verhindert wird. Andererseits wird die Substitution von O9 durch eine Azid-Gruppe vermutlich wegen der wenig geänderten Protein-Bindungsumgebung bei der CSS-Katalyse gut toleriert. Aus diesen Gründen ist es wahrscheinlich, dass C6-Neu5Ac-Analoga,^[216, 217] die den gesamten „Glycerol“-Rest an der C6-Position verloren haben, wegen noch niedrigerer Affinität und schlechterer struktureller Ordnung der katalytischen Reste während der Aktivierungsreaktion nur noch sehr begrenzt zu den entsprechenden CMP-Strukturen umgesetzt werden können.

Tabelle 8: Mögliche spezifische Wechselwirkungen zwischen Aminosäure-Resten der NmCSS und dem Substrat CMP-Neu5Ac.

Atome oder Gruppe in Neu5Ac	Mögliche kontaktierte Reste ^[108]	Mögliche zusätzliche oder alternative Kontakte aus dem Strukturabgleich ^{a)}	Kontaktierte Reste in der Maus-CSS ^[107]
1-COO ⁻	Arg165		Arg202
C4-O	Ser82		
C5-NH	Gln104		Gln141
C7-O	Lys142	Arg165	
C8-O	Gln104 , Asp209, Thr106	Asn175, Gly176, Tyr179	Gln141
C9-O	Tyr179	Arg165, Arg173	
C10-C=O			Arg199
C11-CH ₃	Phe192 , Phe193	Try179	Ile124, Tyr216 , Leu228



a) Daten aus dieser Arbeit.

Das Bindungsmotiv der Acetamid-Gruppe in Neu5Ac wird aus den Protein-Struktur-Daten gut definiert. In der CSS-Röntgenstruktur bilden die drei Aryl-Reste von Phe192, Phe193 und Tyr179 eine hydrophobe Tasche (Abb. 46b), die eine Wechselwirkung mit der unpolaren Methyl-Gruppe am *N*-Acyl-Rest von Neu5Ac in dem ansonsten sehr polaren aktiven Zentrum ausbildet.^[108, 203] In der Maus-CSS-Kristallstruktur wird die entsprechende hydrophobe Tasche durch die Aminosäure-Reste Ile124, Tyr216 und Leu228 gebildet (Abb. 46c), jedoch ist diese Tasche weniger ausgeprägt.^[107] Änderungen in Größe und Polarität der *N*-Acyl-Einheit kann somit zu einer niedrigeren Bindungsaffinität führen. Beispielerweise wird der K_M -Wert bereits ca. vierfach gesteigert, wenn die *N*-Acetyl-Gruppe durch eine tetragonale und polarere Sulfonamid-Gruppe (**176**) ersetzt. Ähnlich wie bei **176** wird die Bindungsaffinität für **171** oder **172** wegen der polaren Hydroxy- bzw. Azido-Gruppe im Vergleich zu Neu5Ac um mehr als eine Größenordnung verringert. Austausch der *N*-Acetyl-Gruppe durch eine unpolarere größere Acyl-Einheit (**173-175**) setzt die Bindungsaffinitäten stärker herabgesetzt, jedoch wird die Katalyse-Geschwindigkeit nicht gleichermaßen gesenkt. Nur die sperrigen Aryl-Gruppen (**174/175**) verursachen eine deutliche Verkleinerung von k_{cat} , andererseits entsteht durch eine flexible, verlängerte Alkyl-Kette (**173**) keine Hemmung der CSS-Aktivität. Interessant ist, dass die CSS für die große Benzoyl-Gruppe (**175**) eine schlechte Substrat-Affinität hat, obwohl diese Gruppe eine günstige π -Stapel-Wechselwirkung mit einer oder mehreren Aryl-Resten der hydrophoben Tasche bilden könnte. In den Mutagenese-Experimenten der Arbeitsgruppe A. Berry wurde bestätigt, dass die hoch konservierte Aminosäure Tyr179 für die CSS-Katalyse eine wichtige Rolle spielt, und offenbar die korrekte Positionierung von Substrat bzw. Bindung des Metall-Kofaktors sowie die von Wassermolekülen oder Hydroxid-Ionen unterstützt.^[203] Die deutliche Verkleinerung von k_{cat} für die Substrate mit großer Aryl-Gruppe an der C5-Position (**174/175**) deutet an, dass die hydrophobe Tasche wahrscheinlich durch die Aryl-Gruppe ausgedehnt wird, was eine

Änderung der Position von Try179 im CSS-Aktivzentrum verursacht, wodurch dieser funktionelle Rest seine Funktionen zunehmend verliert. In der Mutagenese-Studie wurde auch eine starke k_{cat} -Senkung um das ca. 200-fache gezeigt,^[203] wenn Tyr179 durch Alanin ersetzt wird.

Die hohen K_M -Werte der beiden desaminierten Sialinsäuren **169/170** beweisen, dass sie keine effizienten Substrate der CSS sind. Für KDN (**169**) ist der K_M -Wert ca. 330-fach größer als für Neu5Ac, jedoch ist K_M für deren 5-Epimer (**170**) ca. 14-fach größer. Umgekehrt ist k_{cat} für KDN nur ca. 5-fach, jedoch für das 5-Epimer **170** ca. 143-fach kleiner als Neu5Ac. Wegen fehlender *N*-Acetyl-Gruppe bleibt die hydrophobe Tasche leer und die Positionierung der polaren Hydroxyl-Gruppe der beiden Analoga führt vielleicht wegen der resultierenden Lücke in der hydrophoben Tasche zu einer schlechteren Affinität. Da die gesamte Substrat-Orientierung beibehalten werden kann, ist vermutlich der Katalyse-Schritt stärker eingeschränkt. Im Vergleich mit KDN ist die Bindungsaffinität von 5-epi-KDN (**170**) gesteigert. Ein möglicher Grund ist, dass die axiale C5-OH-Gruppe von 5-epi-KDN (**170**) eine günstigere Konformation in der hydrophoben Tasche erlaubt, so dass die resultierende Lücke dort kleiner ist als für KDN. Jedoch wird die Position und die Funktion der konservierten Aminosäure Try179 dadurch geändert, was zu einer niedrigeren Katalysegeschwindigkeit führt. Um die Situation der CSS-aktive Zentrum genauer studieren zu können, sind weitere kinetische Untersuchungen an ortsspezifischen Mutanten^[203] mit strukturellvariierten Substrat-Analoga nötig.

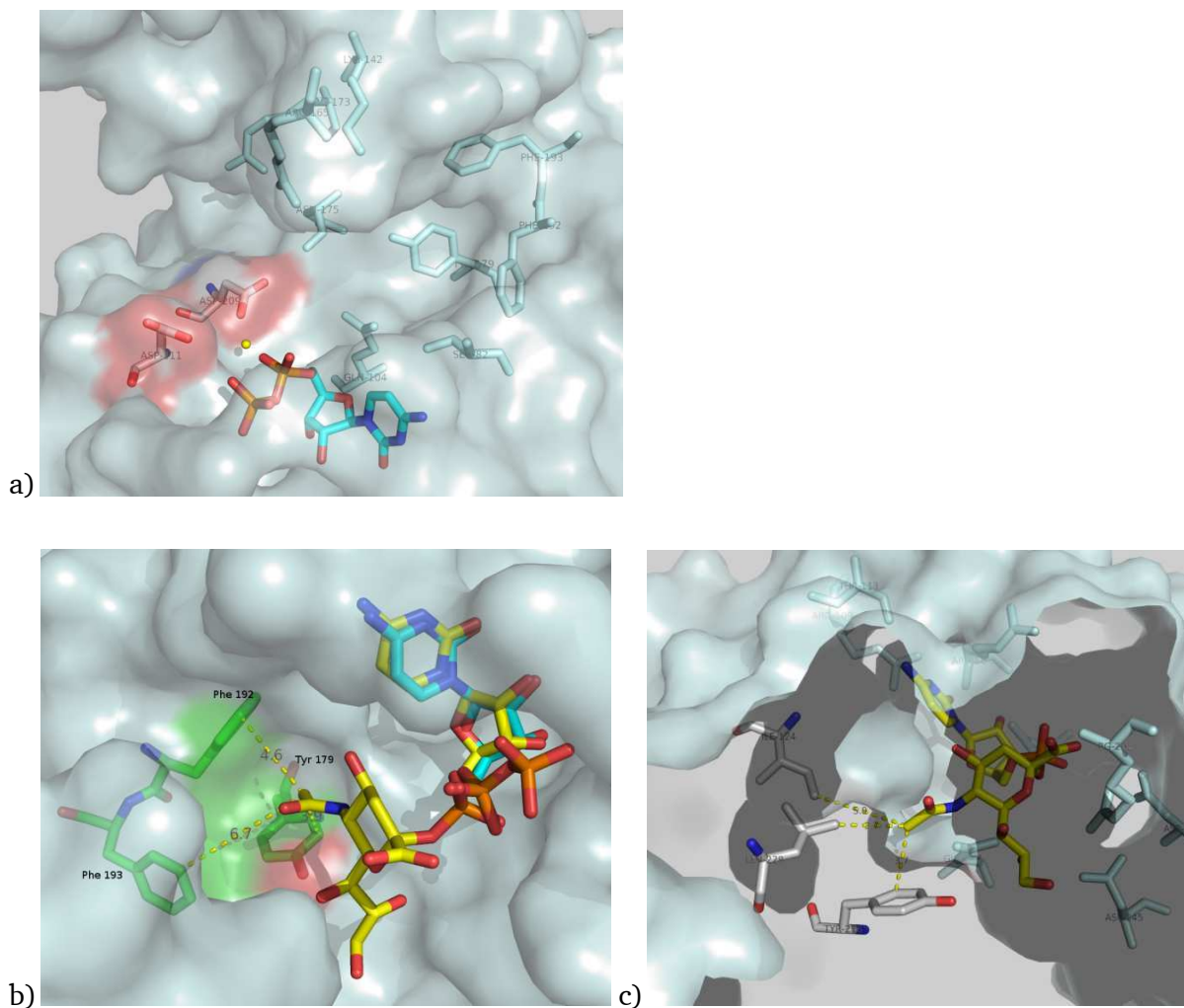


Abb. 46: a) die NmCSS-Kristallstruktur, die mit der X-Ray-Struktur von K-CKS (PDB Entry 3K8D^[106]) überlagert wurde, inklusive Mg^{2+} (gelbe Kugel), CDP (blau) und Aminosäure-Resten (weiß); b) hydrophobe Tasche für die C11-Methyl-Gruppe in der NmCSS; c) hydrophobe Tasche für die C11-Methyl Gruppe in der Maus-CSS mit den C7-, C8- und C9-OH-Gruppen wechselwirkenden Aminosäureresten. Gelbe Strukturen in b) und c) sind CMP-Neu5Ac; grüne und weiße Strukturen in b) und c) sind Aminosäurereste.

3.2.4. Kinetische Studien mit verschiedenen CSS-Mutanten

Aus den kinetischen Studien der CSS mit verschiedenen Substratanaloga steht fast, dass die meisten der Neu5Ac-Derivate und -Analoga (169-176) keine guten Substrate der CSS sind unter anderem, weil die K_M -Werte der Sialinsäuren, wie z.B. die von KDN (169), Neu5Hex (173), Neu5PhAc (174) oder Neu5Bz (175), im Vergleich mit dem K_M -Wert von Neu5Ac (160) deutlich größer sind (Abb. 47).

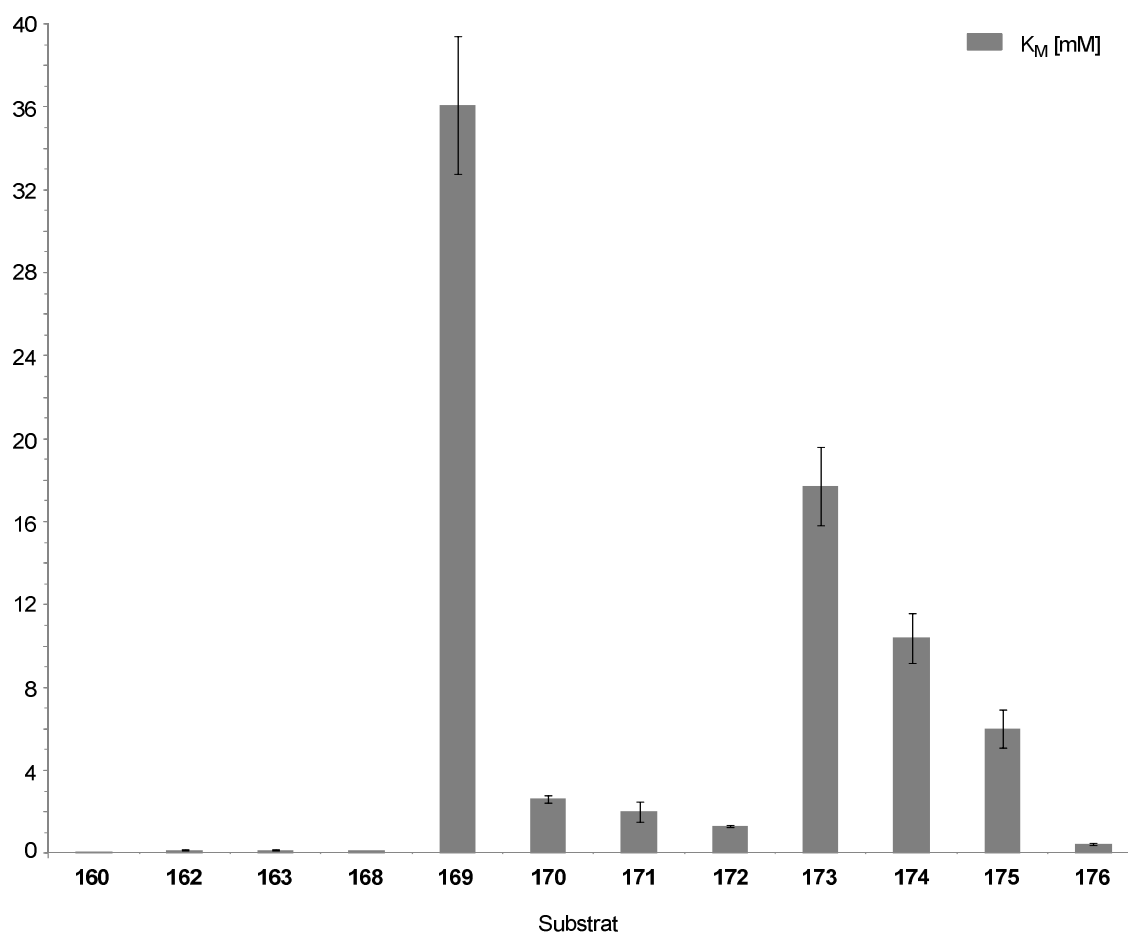


Abb. 47: Vergleich der K_M -Werte der CSS für Neu5Ac (**160**) und deren Derivaten und Analoga.

Um die strukturellen Beiträge zur Substrat-Affinität und zur katalytischen Effizienz für die modifizierten Sialinsäuren bzw. den Mechanismen der CSS-Katalyse noch besser zu verstehen, wurden die kinetischen Untersuchungen auf sechs von *L. Horsfall* hergestellten und im Arbeitskreis von Prof. A. Berry verfügbaren CSS-Mutanten F192A, F193A, N175A, Q104A, R173A und D209A ausgedehnt, wofür 10 verschiedene Substrate inklusive der Neu5Ac (**160**), ihren Analoga, KDN (**169**) und epi-KDN (**170**), verkürzte Neu5Ac-Derivate, C8- (**163**) und C7-Neu5Ac (**168**), 9-Azido-Neu5Ac (**162**) und 5 *N*-modifizierten Neu5Ac (**171**, **173**, **175-176**) mit Hilfe des neuen pH-Assays getestet wurden. Die Reaktionsbedingungen waren ähnlich denen der Messung für den CSS-Wildtyp. Die Endkonzentration an CTP wurde für alle Messungen konstant bei 0.5 mM gehalten, und die Konzentrationen der verschiedenen Sialinsäuren wurden variiert. Nach der Messung wurden die Messdaten durch die *Michaelis-Menten*-Gleichung mit der Hilfe des Programms *Origin 8.5* analysiert. Die dadurch bestimmten

kinetischen Parameter, K_M , k_{cat} und k_{cat}/K_M , der verschiedenen CSS-Mutanten für die 10 Substrate sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Mit den pH-Assay gemessene und mittels *Michaelis-Menten*-Analyse bestimmte kinetische Parameter von CSS-Mutanten mit verschiedenen Sialinsäuren.

	WT	F192A	R173A	F193A	N175A	Q104A	D209A
Neu5Ac (160)							
K_M [mM]	0.11±0.01	1.91±0.1	0.56±0.1	0.5±0.1	0.78±0.3	3.02±0.27	
k_{cat} [s ⁻¹]	18.6±0.4	36.3±0.8	4.4±0.2	8.6±0.4	0.92±0.15	20.4±0.7	/
k_{cat}/K_M	169.1	19.0	7.8	17.3	1.2	6.7	
Neu5Ac-9N ₃ (162)							
K_M [mM]	0.16±0.02	2.43±0.22	0.39±0.03	0.71±0.07		2.99±0.19	
k_{cat} [s ⁻¹]	5.67±0.14	12.0±0.7	3.7±0.2	8.1±0.3	/	15.5±0.5	/
k_{cat}/K_M	35.4	4.9	9.6	11.5		5.2	
C8-Neu5Ac (163)							
K_M [mM]	0.17±0.01	1.71±0.1	0.29±0.04	0.52±0.06	0.32±0.04	1.1±0.2	
k_{cat} [s ⁻¹]	5.12±0.07	10.2±0.3	3.7±0.1	4.9±0.2	1.2±0.1	4.9±0.3	/
k_{cat}/K_M	30.1	6.0	12.9	9.4	3.8	4.4	
C7-Neu5Ac (168)							
K_M [mM]	0.16±0.01	0.15±0.01	0.23±0.04	0.60±0.17	0.15±0.02	0.48±0.13	
k_{cat} [s ⁻¹]	0.29±0.01	0.16±0.01	0.15±0.01	0.12±0.02	0.19±0.01	0.07±0.01	/
k_{cat}/K_M	1.8	1.1	0.65	0.20	1.3	0.15	
KDN (169)							
K_M [mM]	36.1±3.3	38.3±3.3	53.4±10.6	62.2±9.2	19.0±2.6	26.2±4.6	71.9±13.4
k_{cat} [s ⁻¹]	4.10±0.17	1.8±0.1	1.9±0.2	1.3±0.1	0.92±0.05	0.42±0.03	0.44±0.06
k_{cat}/K_M	0.11	0.05	0.03	0.02	0.05	0.02	0.01
epi-KDN (170)							
K_M [mM]	2.6±0.2	5.1±2.1	1.7±0.2	12.5±7.0	5.5±0.9	8.4±2.2	2.88±1.03
k_{cat} [s ⁻¹]	0.13±0.01	0.07±0.01	0.04±0.02	0.28±0.10	0.10±0.01	0.09±0.02	0.06±0.01
k_{cat}/K_M	0.05	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02
Neu5Gc (171)							
K_M [mM]	2.0±0.5	6.5±2.4	5.2±1.3	6.0±1.6		17.2±9.5	
k_{cat} [s ⁻¹]	4.8±0.3	3.9±0.7	3.2±0.3	1.80±0.23	/	3.6±1.4	/
k_{cat}/K_M	2.4	0.61	0.61	0.30		0.21	

Neu5Hex (173)							
K_M [mM]	17.7 ± 1.8	1.4 ± 0.2	10.6 ± 2.4	5.4 ± 0.5	4.4 ± 0.9		
k_{cat} [s^{-1}]	11.8 ± 0.6	9.3 ± 0.6	3.4 ± 0.5	12.9 ± 0.5	0.43 ± 0.04	/	/
k_{cat}/K_M	0.67	6.9	0.32	2.4	0.10		
Neu5Bz (175)							
K_M [mM]	5.5 ± 0.6	2.3 ± 0.2	1.01 ± 0.15	11.0 ± 5.2	5.4 ± 2.7	1.7 ± 0.4	0.16 ± 0.03
k_{cat} [s^{-1}]	0.35 ± 0.01	3.0 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.31 ± 0.06	0.35 ± 0.09	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01
k_{cat}/K_M	0.06	1.3	0.10	0.03	0.07	0.04	0.50
Neu5Ms (176)							
K_M [mM]	0.46 ± 0.04	1.4 ± 0.1	0.33 ± 0.06	0.53 ± 0.11	0.13 ± 0.02	2.3 ± 0.1	
k_{cat} [s^{-1}]	8.2 ± 0.3	1.6 ± 0.1	2.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1	0.19 ± 0.01	1.1 ± 0.03	/
k_{cat}/K_M	17.8	1.1	8.5	3.0	1.5	0.47	
Einheit von k_{cat}/K_M : $mM^{-1} s^{-1}$; WT: NmCSS-Wildtyp							

Aus der Betrachtung der kinetischen Daten in der Tabelle 9 ist ersichtlich, dass die Mutanten für die meisten Substrate keine bessere Bindungsaffinität und katalytische Effizienz mitbringen. Besonders die Mutante D209A zeigt mit den verschiedenen Substraten nur sehr kleine Reaktionsgeschwindigkeiten, wodurch die kinetischen Parameter dieser Mutante weder für Neu5Ac, noch für die meisten ihrer Derivate bestimmt werden konnten. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit Resultaten der Mutagenese-Studie,^[203] wonach die Aminosäure Asp209 eine bedeutende Rolle bei der Bindung des Mg^{2+} -Kofaktors spielt (Abb. 46a). Wenn Asp209 durch Alanin ersetzt wird, wird die Metall-Affinität des Enzyms wegen des Verlustes der zweizähligen Wechselwirkung mit Mg^{2+} schlechter. Die k_{cat} -Werte von D209A für KDN (169), ihres 5-Epimer (170) oder Neu5Bz (175) konnten zwar bestimmt werden, sind aber deutlich kleiner als die des Wildtyps. Eine weitere Mutante mit sehr niedriger Katalyseaktivität ist Q104A. Gln104 ist ein hochkonservierter aktiver Rest und kann mit C5-NH- und C8-OH-Gruppe durch Wasserstoffbrücken wechselwirken. Nach der Mutagenese-Studie ist Gln104 nicht nur an der Bindung von Neu5Ac, sondern auch in der Reorientierung der Mg^{2+} -Bindung während der Wieder-Öffnung des aktiven Zentrums nach der Produktbildung beteiligt.^[203] Deswegen führt die Mutante Q104A für alle Substrate hier zu schlechter katalytischer Effizienz, die ca. 5~38-fach kleiner ist als die des Wildtyps oder anderer Mutanten. Ihre K_M -Werte für Neu5Ac, Neu5Ac-9N₃, C8-Neu5Ac und den zwei mit polaren *N*-Acyl-Gruppen substituierten Neu5Ac-Derivaten 171, 176 sind deutlich größer als die Wildtyp- K_M -Werte, besonders für Neu5Ac ist K_M ca. 27-fach größer als beim Wildtyp. Jedoch ist ihre k_{cat} fast mit

dem des Wildtyps identisch, was mit den Resultaten der Mutagenese-Studie^[203] übereinstimmt. Für C7-Neu5Ac, KDN und epi-KDN sind die K_M -Werte von Q104A ähnlich denen des Wildtyps, jedoch betragen ihre k_{cat} -Werte nur 22%, 10% und 7% der des Wildtyps.

Die Mutanten R173A, F193A und N175A zeigen untereinander ähnliche Substrat-Affinität für Neu5Ac, Neu5Ac9N₃, C8-, C7-Neu5Ac, KDN, Neu5Gc und Neu5Ms bzw. ihre K_M -Werte befinden sich in der gleichen Größenordnung wie die des Wildtyps. Wenn der Rest Arg173 zu Alanin mutiert wird, kann eine kleine Steigerung der K_M -Werte für Neu5Ac, Neu5Ac9N₃, C8-, C7-Neu5Ac, KDN und Neu5Gc beobachtet werden. Für epi-KDN und 5-*N*-modifizierten Neu5Ac-Derivaten (171, 173, 175-176) werden die K_M -Werte etwas (kleiner als 5 fach) gesenkt. Das bedeutet, dass Arg173 wegen dessen großen Abstands zu den Substraten wenig zur Funktion des aktiven Zentrums beiträgt. Die Mutante F193A besitzt eine ähnliche katalytische Geschwindigkeit (k_{cat}) wie der Wildtyp für alle hier betrachteten Substrate, hat aber eine schlechtere Affinität als der Wildtyp für die meisten der Sialinsäuren mit Ausnahme von Neu5Hex (173).

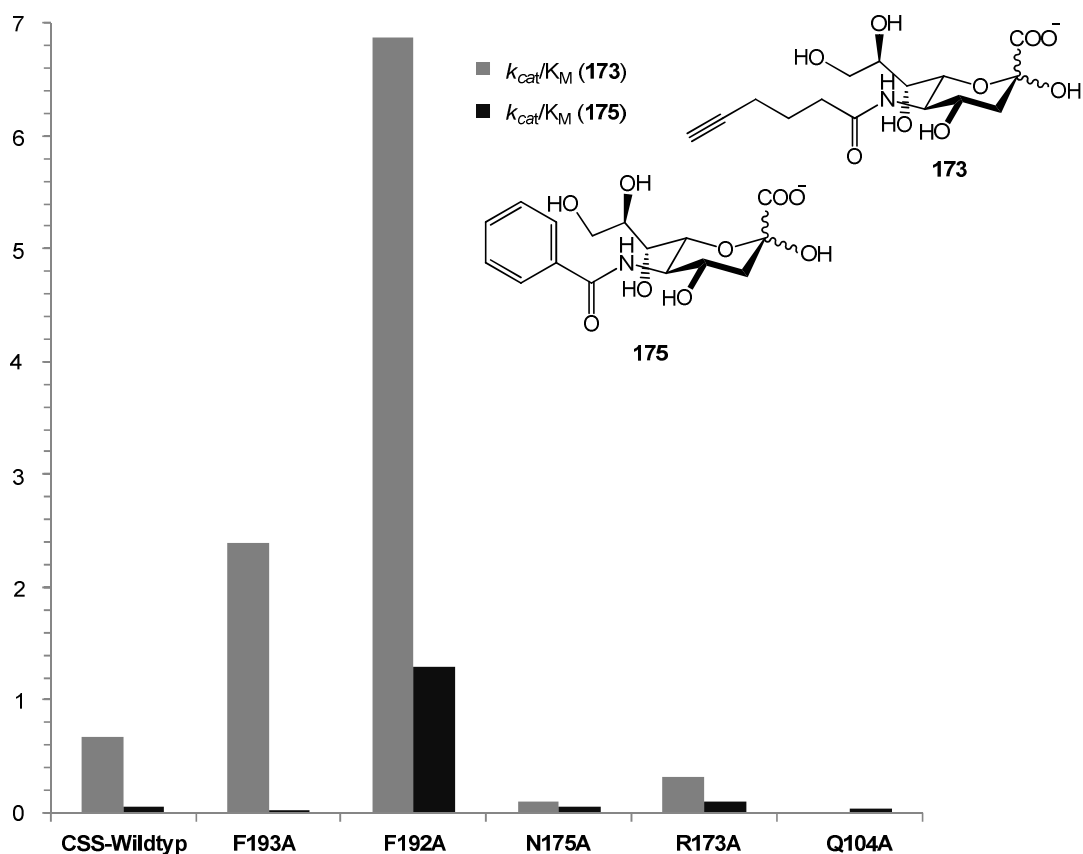


Abb. 48: Vergleich der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) der CSS und ihrer Mutanten für die Sialinsäuren **173** und **175**.

Die kinetischen Parameter (Tabelle 9) für die zwei mit großen unpolaren *N*-Acyl-Gruppen substituierten Neu5Ac-Derivate **173** und **175** zeigen, dass die Mutante F192A für diesen Substrattyp die beste katalytische Effizienz im Vergleich zum Wildtyp und anderen Mutanten besitzt (Abb. 48). Durch Austausch von Phe192 zu Alanin wird der k_{cat} -Wert für das *N*-Hexinoyl-modifizierte Neu5Ac-Derivat (**173**) kaum verändert, jedoch wird der K_M -Wert gegenüber dem Wildtyp ca. 13-fach verkleinert. Für die Sialinsäure **175** mit einer *N*-Benzoyl-Gruppe ist der K_M -Wert mit F192A ca. 2-fach kleiner als beim Wildtyp, aber der k_{cat} ist ca. 9-fach größer. Diese Resultate belegen, dass die durch Phe192, Phe193 und Tyr179 gebildete hydrophobe Tasche (Abb. 49a) für die Bindungsaffinität eine große Rolle spielt. Wenn Phenylalanin192 zu Alanin mutiert wird, wird die hydrophobe Tasche vergrößert (Abb. 49b). Die besseren Affinitäten der Mutante F192A für **173** und **175** bedeuten, dass sich die mit Ala192 vergrößerte hydrophobe Tasche den großen *N*-Acyl-Gruppen von **173** und **175** besser anpassen kann, womit die Bindungsaffinität verbessert wird. Die Steigerung des k_{cat} von

F192A für Neu5Bz im Vergleich mit dem Wildtyp bedeutet, dass sich die große *N*-Benzoyl-Gruppe von **175** in der vergrößerten hydrophoben Tasche räumlich besser orientiert als beim Wildtyp, womit sich die Position der hochkonservierten Aminosäure Tyr179 vermutlich nicht geändert hat.

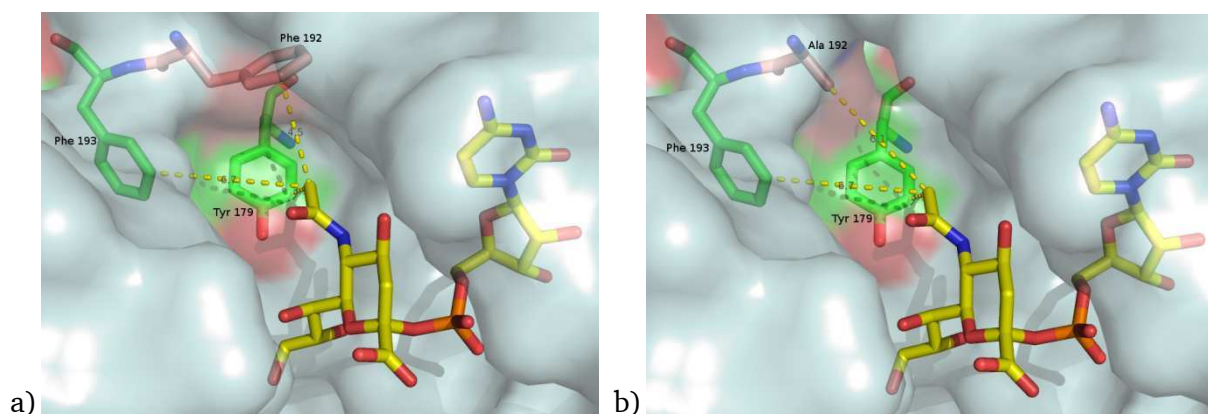


Abb. 49: Struktur-Überlagerung der CSS aus *Neisseria meningitidis* (PDB Entry 1EYR^[108]) mit der Maus-CSS, inklusive Ligand CMP-Neu5Ac (gelb) (PDB Entry 1QWJ^[107]). a) hydrophobe Tasche aus den Aminosäuren Phe193, Tyr179 (in grüner Farbe) und Phe192 (lila) im Wildtyp; b) Erweiterung der hydrophoben bei Punktmutation zu Ala192 (lila).

Zusammenfassend besitzen die Mutanten R173A, F193A, N175A, Q104A und D209 für die 10 verschiedenen Sialinsäuren (**160**, **162-163**, **168-171**, **173**, **175-176**) keine bessere katalytische Effizienz als der Wildtyp (Tabelle 9). Eine interessante Mutante ist die CSS-F192A, die für die mit großen unpolaren *N*-Acyl-Gruppen substituierten Neu5Ac-Derivate **173** und **175** die beste Katalyse-Effizienz zeigt, ca. 10- und 22-fach größer als der Wildtyp. Diese Mutante scheint für die Aktivierung von Sialinsäuren mit großen *N*-Acylresten ähnlich denen in **173** oder **175** im präparativen Maßstab weit besser geeignet zu sein als der CSS-Wildtyp.

3.2.5. Anwendungen der CSS für präparative Aktivierung nicht-natürlicher Sialinsäuren

Mit Hilfe der kinetischen Daten der CSS für verschiedene Sialinsäuren, die mit Hilfe des neu entwickelten einfachen pH-Assays bestimmt wurden, konnte die Aktivierungsfähigkeit

unterschiedlicher Sialinsäuren leicht und schnell bestimmt werden. So kann man die benötigte CSS-Menge für präparative Synthesen der CMP-Sialinsäuren gut abschätzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verschiedenen CMP-Sialinsäuren, die in Tabelle 10 gelistet sind, aus CTP und entsprechenden hergestellten Sialinsäuren durch die CSS synthetisiert (Abb. 51). CTP als das Standard-CSS-Donorsubstrat konnte in situ aus CMP und katalytischen Mengen von CDP durch Komproportionierung zu CDP, das durch Pyruvat-Kinase mit PEP wieder zu CTP regeneriert wird,^[218] mit Adenylat-Kinase und Pyruvat-Kinase nach Literaturvorschrift hergestellt werden (Abb. 50).^[110, 219, 220]

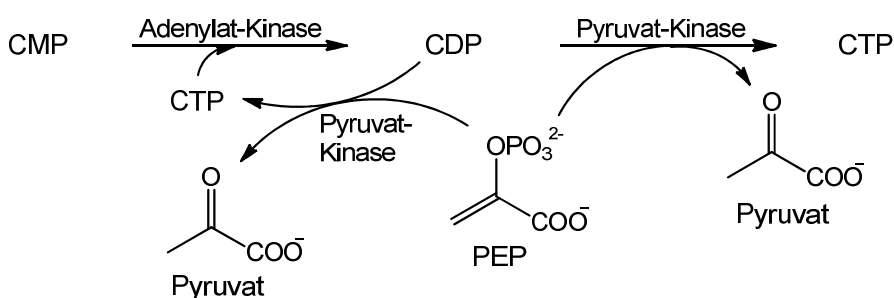


Abb. 50: Enzymatische Regenerierung von CTP aus CMP.

Während der Sialinsäure-Aktivierung wurde anorganische Pyrophosphatase als Hilfsenzym verwendet, um den entstehenden Inhibitor Pyrophosphat PP_i zu Phosphat zu spalten, (Abb. 51) so dass die Aktivierungsgeschwindigkeit beschleunigt wird und die Reaktion vollständig ablaufen kann. Der pH-Werte des Reaktionssystems sollte ständig kontrolliert und annähernd konstant bei 8.6 gehalten werden, um die Zersetzung der gebildeten CMP-Produkte durch Hydrolyse in neutraler bis schwach saurer Umgebung (pH 5.0-6.9) zu vermeiden.

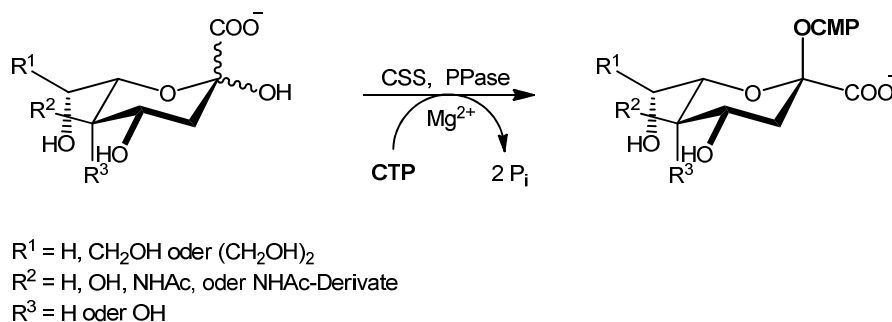
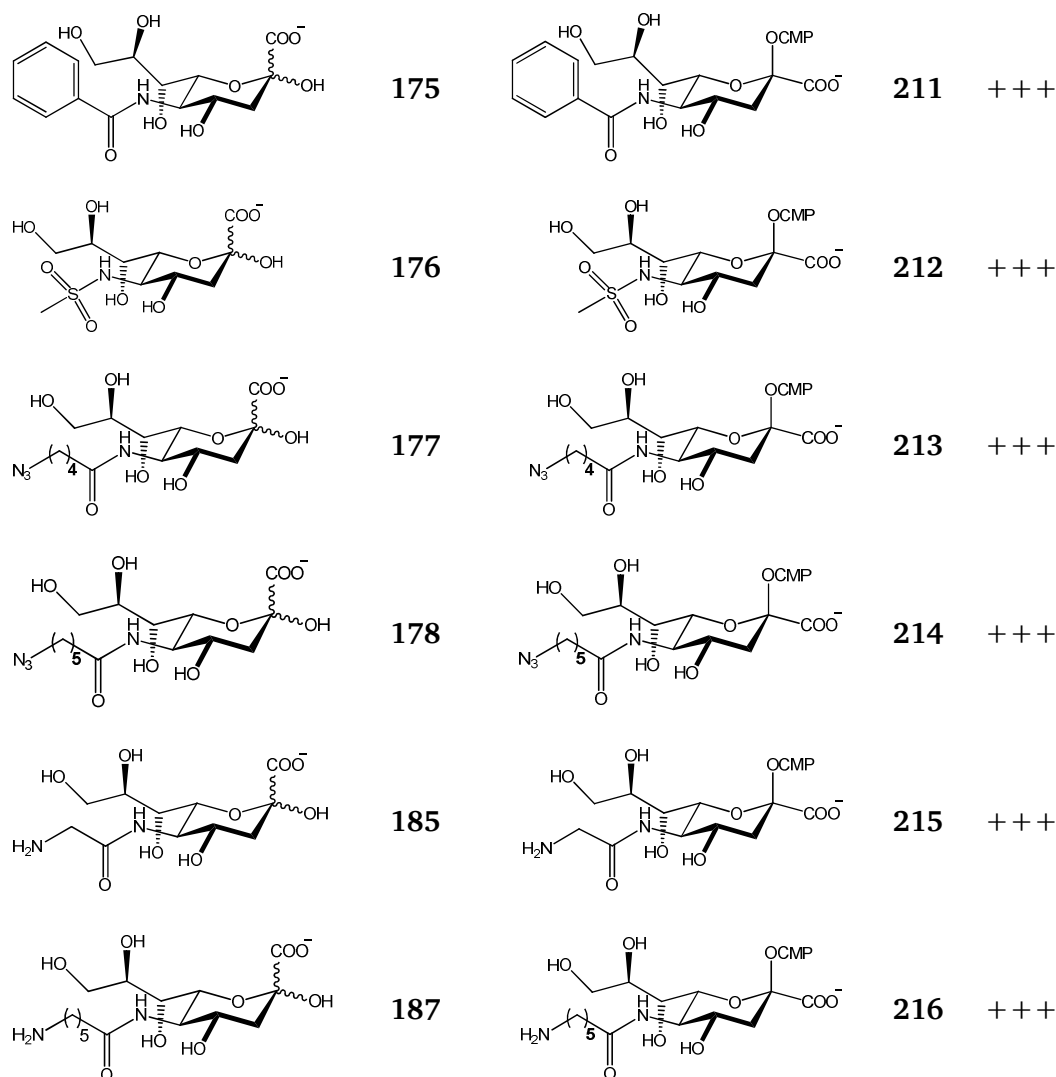


Abb. 51: Aktivierung der unterschiedlichen Sialinsäuren durch CSS.

Tabelle 10: Enzymatisch durch CSS-Katalyse synthetisierte CMP-Sialinsäuren.

Edukt	Nr.	Produkt	Nr.	Ausbeute	Lit.
	160		201	71%	[69, 78, 104, 221]
	161		202	49%	[78, 160]
	162		203	++	[126, 160]
	163		204	++	
	168		205	++	
	169		206	++	
	170		207	++	
	171		208	+++	[78, 160]
	172		209	+++	[78]
	173		210	+++	



++: quantitative Umsetzung, aber Produkt nicht isoliert, sondern direkt im Sialyltransfer für die Synthese von entsprechenden Sialokonjugaten verbraucht.

CMP-Neu5Ac (**201**), ein natürliches Nucleotid-Donorsubstrat für den Sialyltransfer, das aus *E. coli* K235 erstmalig isoliert wurde,^[222] wurde hier durch die NmCSS aus Neu5Ac unter Verbrauch von CTP quantitativ gebildet, jedoch betrug die isolierte Ausbeute wegen der Zersetzlichkeit des Produktes während der Aufreinigung über BioGel P2 insgesamt nur 71%. Das Produkt war NMR-spektroskopisch rein. CMP-KDN-9N₃ (**202**) wurde nach zweifacher Säulenchromatographie über BioGel P2 mit einer Ausbeute von 49% erhalten und durch ¹H- und ¹³C-NMR-Daten identifiziert. KDN-9N₃ (**161**) ist ein schlechteres Substrat der CSS als Neu5Ac, konnte aber mit einer entsprechend größeren Enzymmenge quantitativ (DC-Kontrolle) zum Produkt **202** umgesetzt werden, das leider im Verlauf der Aufreinigung im Neutralen teilweise hydrolysiert wurde. Dieses Problem könnte dadurch gelöst werden, dass

das Elutionsmittel auf einen pH-Wert von ca. 9.0 eingestellt wurde, bei dem das GPC-Material noch stabil ist.

Die unterschiedlichen CMP-Sialinsäuren **204-216** konnten durch die CSS mit unterschiedlichen Ansatzgrößen aus den entsprechenden Sialinsäuren hergestellt werden. Die Umsetzungen waren nach den DC-Kontrollen vollständig. Um die Produktmenge nicht zu verringern, wurden die Produkte direkt nach der enzymatischen Aktivierung und Ethanol-fällung von Proteinen und Puffersalzen nur durch Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile, nicht jedoch durch Chromatographie über BioGel aufgereinigt. Zur Charakterisierung solcher aktivierten Produkte wurden die CMP-Sialinsäuren ohne oder nach grober Aufreinigung direkt in die nachfolgenden Sialyltransferase-katalysierten Reaktionen eingesetzt. Die entsprechend gebildeten Sialokonjugate wurden dann durch ESI-MS, ^1H - und ^{13}C -NMR eindeutig identifiziert.

Der Umsatz der Sialylierungsreaktion konnte bei Verwendung des mit Acridon verlinkten Akzeptorsubstrats Lac-P-Acr (**105**) durch Dünnschichtchromatographie (DC) leicht und schnell kontrolliert werden. Als Beispiele sind in Abb. 52 die Probe-Sialyltransfers aus Donoren **209** und **213-216** und dem Akzeptor Lac-P-Acr (**105**) (Abb. 52) gezeigt, wobei die CMP-Konjugate (**209**, **213-216**) enzymatisch durch die α 2,6-Sialyltransferase aus *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145^[138] mit Lac-P-Acr (**105**) zu den entsprechenden Sialokonjugaten umgesetzt wurden. Die DC-Kontrolle nach 30-minütiger Reaktionszeit zeigt, dass alle Sialokonjugate **248**, **252-255** mit vergleichbarer Geschwindigkeit gebildet wurden. Das sialylierte Produkt **248** wurde außerdem präparativ hergestellt und durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Analyse charakterisiert.

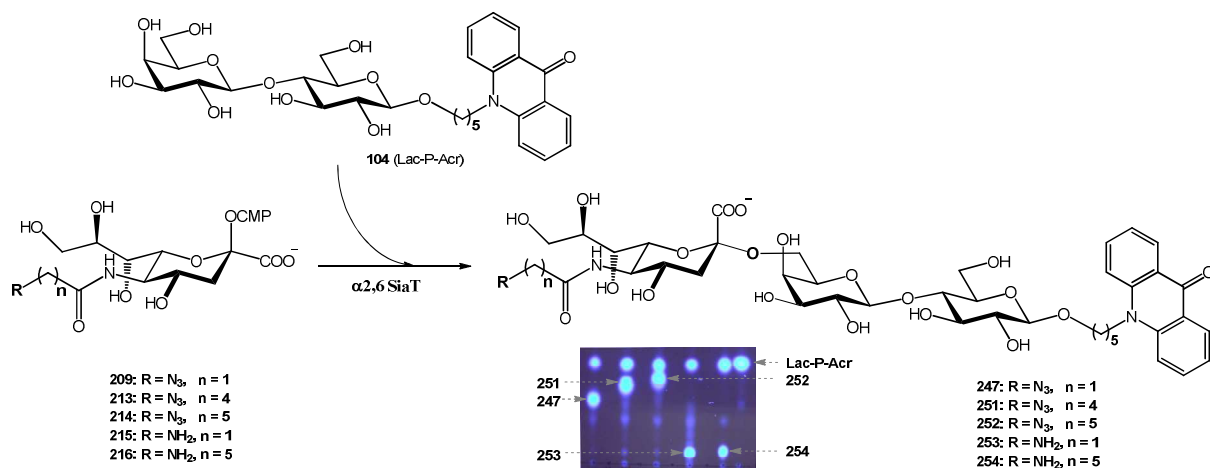


Abb. 52: Verifizierung der mit Azid und Amin funktionalisierten CMP-Sialinsäuren über enzymatischen Sialyltransfer.

Die Amino-Gruppe war durch heterogene Hydrierung der Azidvorstufe mit *Lindlar*-Katalysator Pd/CaCO₃ gebildet worden,^[192] wobei das Produkt **215** aus **209** nach Säulenchromatographie in einer Ausbeute von 59% erhalten und durch ESI-MS analysiert werden konnte. Das Reaktionssystem Pd/C in DMSO konnte auch für die Amin-Bildung verwendet werden, aber wegen der schwierigen Entfernung von DMSO ist diese Methode ungünstiger. Die Staudinger-Reduktion bietet milde Reaktionsbedingungen für die Synthese von Aminen aus Aziden, jedoch erbrachte sie für **209** leider keinen vollständigen Umsatz. Eine alternative Methode für die präparative Synthese von **215** war die direkte Aktivierung von **185**, was erstmals durch die CSS aus Rinderhirn gelungen war.^[223, 224] Tatsächlich konnte auch **215** durch die NmCSS aus **185** durch direkte Aktivierung quantitativ hergestellt werden (Abb. 53). Mit dieser Erfahrung konnte danach auch die andere mit Amin funktionalisierte Sialinsäure **187** durch die CSS direkt zu der entsprechenden CMP-Sialinsäure **216** praktisch quantitativ aktiviert werden.

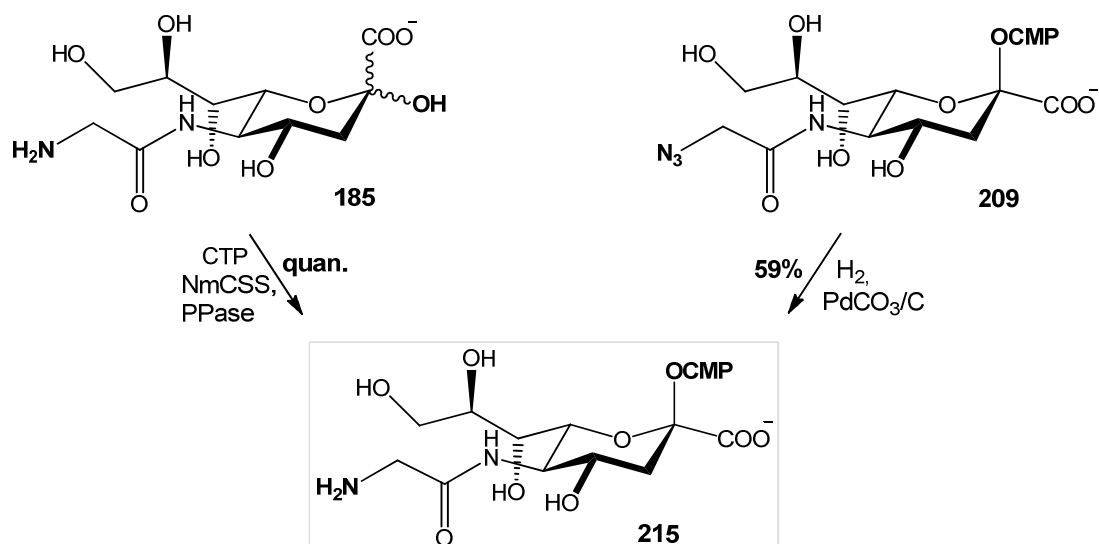


Abb. 53: Synthesewege zur Glycin-konjugierten CMP-Sialinsäure 215.

3.3. Fluoreszenzmarkierung biologischer Komponenten durch Sialyltransferase

3.3.1. Einleitung

Die Visualisierung biologischer Phänomene mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern ist eine sehr attraktive Methode im Forschungsbereich der chemischen Biologie. Als Targets können die funktionellen Biopolymere, wie z.B. mit funktionellen Gruppen modifizierte Proteine, Glykane, Glycolipide oder Glycoproteine von Zellbestandteilen oder auf Zelloberflächen, Zellwänden bzw. extrazellulärer Matrix verwendet werden und durch Fluoreszenzchromophore ex vivo oder in vivo markiert werden. Die funktionalisierten Biopolymere können rein metabolisch gebildet oder post-synthetisch modifiziert werden.

Für die metabolische Methode wird ein modifiziertes Produkt über den regulären Stoffwechselweg normalerweise enzymatisch in vivo hergestellt, wobei die mit einer speziellen funktionellen Gruppe versehene Vorstufe von den beteiligten Stoffwechsel-Enzymen in der Zelle akzeptiert werden kann. Alternativ kann der Markierungsschritt post-synthetisch auf chemischem oder enzymatischem Weg in vivo oder ex vivo durchgeführt werden. Die häufig mit funktionellen Gruppen wie z.B. Alkin, Azid, Amin, Keton usw. modifizierten Biopolymere werden unter anderem auch für die Kupplung mit Fluoreszenzchromophoren für bildgebende Verfahren benötigt.

In den letzten Jahren wurde die Technologie für die selektive Modifikation von biologischen Spezies in lebenden Systemen entwickelt, was neue Einblicke in zelluläre Prozesse ermöglichte.^[225] Der Schlüssel dieser neuen Technologie sind bio-orthogonale chemische Reaktionen, deren Komponenten unter physiologischen Bedingungen schnell und selektiv miteinander reagieren müssen, aber praktisch inert gegenüber typischen Funktionalitäten sind, die in üblichen Biomolekülen im Zellstoffwechsel vorkommen. Der Begriff „bio-orthogonale Chemie“ wurde von *Bertozzi* im Jahr 2000 mit der Entwicklung der Staudinger-Ligation für die Modifizierung von Zelloberflächen geprägt.^[162] Mittels der bio-orthogonalen metabolischen Markierungsstrategie können lebende Zellen ohne Störung der natürlichen biologischen Prozesse chemisch in vivo markiert werden, z.B. mit Fluoreszenz- und Radionuklid-Markierung von metabolisch sialylierten Glykanen in Maus-Tumorzellen nach Staudinger-Ligation mit biotinyliertem Phosphin in vivo,^[226] um die Tumorprogression zu beobachten und neue Behandlungsmethoden zu entwickeln.

Viele biologische Ereignisse wie Zellwachstum und Differenzierung, die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen, die Erkennung löslicher Faktoren, und die Anhaftung an oder der Rückzug aus der extrazellulären Matrix werden von Zelloberflächen-Molekülen geregelt.^[227] Sialinsäuren als die Hauptkomponenten auf der Zelloberfläche nehmen an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen teil. Daher sind fluoreszenzmarkierte Sialinsäuren von Interesse, die helfen können, die modifizierten Zellen, biologische Phänomene wie Zell-Zell-Adhäsion, Wachstumsregulierung oder Entzündungsprozesse durch Fluoreszenzmarkierung an so modifizierten Zellen zu visualisieren.

Eine wichtige Methode für die Modifizierung der Zelloberflächen sind die bio-orthogonalen Reaktionen, zu denen zuerst die Kondensationen aus Aldehyden oder besser Ketonen mit nucleophilen Biomolekülen gehören.^[228] Aldehyde und Ketone, die nicht in Proteinen oder deren assoziierten Glykanen gefunden werden, haben orthogonale Reaktivitäten zusammen mit diesen Biomolekülen und können mit Aminoxy- oder Hydrazin-Gruppen zu stabileren Oximen oder Hydrazonen kondensiert werden. Solche Kondensationsreaktionen wurden vor Jahrzehnten für in situ Medikament-Bildung in Säugetierzellen^[229] bzw. für die Markierung von Glykanen^[227] und Proteinen^[230] durch metabolisch eingebaute Keton-funktionalisierte Zucker und Aminosäuren in Säugetier- und Bakterienzellen verwendet. Zwei weitere wichtige Typen von bio-orthogonalen Reaktionen sind die in jüngster Zeit entwickelte Staudinger-Ligation^[162] von Aziden und Phosphenen bzw. die kupferfreie Click-Reaktion^[231] von Aziden mit hochgespannten Cycloalkinen. Mehrere Arbeitsgruppen haben es geschafft, verschiedene mit nicht natürlichen Azid-Komponenten gekoppelte Glykane,^[162, 232-235] Proteine^[236] und Nukleinsäuren^[237] metabolisch in Zellen, Zebrafischembryonen oder Mäusen zu produzieren, um diese Azid-modifizierten Targets anschließend mit Phosphin- oder Alkin-funktionalisierten Chromophoren mittels Staudinger-Ligation oder kupferfreier Click-Reaktion zu verknüpfen. Die so gebildeten fluoreszenzmarkierten Biomoleküle können dann für verschiedene in vivo-Studien genutzt werden, wie z.B. für die Proteomik-Analyse von Glycoproteinen, das Profiling von Enzymaktivitäten, Untersuchungen zu Nukleinsäure-Wechselwirkungen und das Monitoring des Protein-Turnovers.^[228, 238]

Außer den oben beschriebenen biochemischen Methoden (zuerst Metabolisierung von Substratanaloga, dann chemische Verknüpfung von Fluoreszenzmarkern mit Zelloberflächen mittels Kondensations-, Staudinger- oder Click-Reaktion) kann bei sialylierten Glykanen auch eine enzymatische Methode durch Sialyltransfer für die Bildung von fluoreszenzmarkierten Zelloberflächen genutzt werden. Beispielsweise haben *Bollheimer et al.*^[239] chemisch

Im Vergleich zu Cumarin-Derivaten haben Fluorescein- und Rhodamin-Derivate ein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge oberhalb von 500 nm. Das gelb-grün emittierende Fluorescein ist einer der am häufigsten verwendeten Fluorophore bei der Markierung von Peptiden und Proteinen.^[253] Die beliebteste Fluorescein-Verbindung zur Konjugation von Proteinen ist das kommerziell verfügbare Fluoresceinisothiocyanat (FITC; Abb. 55).^[245] Beispielsweise wurde FITC für die Kennzeichnung von Eisen-freiem menschlichem monomerem Serum-Glycoprotein verwendet.^[254, 255] In aktuellen Forschungsprogrammen wurde FITC in der Entwicklung von mechanolumineszierendem Material (eine Technik für das *Bioimaging*)^[256] und Immunoassays^[257], für die Visualisierung von lebenden Krebszellen^[258] und speziellen mRNAs in lebenden Zellen^[259] eingesetzt. Jedoch haben Fluorescein-derivatisierte Luminophore auch einige Nachteile: relativ schnelle Photobleichung, pH-sensitive Fluoreszenz, ein relativ breites Fluoreszenzemissionsspektrum und eine Tendenz zur Selbst-Quenchung bei Konjugation an Biopolymeren, insbesondere bei einem hohen Grad der Substitution.^[245] Rhodamin gehört zu den ältesten synthetischen Farbstoffen und wird seit langem für das Färben von Papier und Textilien verwendet. Es hat einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten im sichtbaren Bereich und zeigt starke rote Fluoreszenz. Ein reaktives Rhodamin-Derivat ist das Lissamin-Rhodamin-B-Sulfonylchlorid (**RhoB-Cl**; Abb. 55), ein kommerziell verfügbares, aber sehr teures Reagenz, dessen Synthese im Maßstab von 100 g aus Lissamin-Rhodamin-B und Oxalylchlorid erstmals von *Beatty et al.* beschrieben wurde.^[260] Wegen seiner funktionellen Sulfonylchlorid-Gruppe kann **RhoB-Cl** unter milden Reaktionsbedingungen leicht mit einer NH₂-Gruppe verknüpft werden, was die Herstellung von Rhodamin-markierten fluoreszierenden Proteinen und Peptiden ermöglicht.^[261-266] Damit konnten die Eigenschaften und Funktionen von Biomolekülen durch Laser-Fluoreszenzmikroskopie hoch sensitiv detektiert werden. Beispielsweise haben *Bai et al.* **RhoB-Cl** mit Translokator-Protein-selektiven Liganden konjugiert und damit das Translokator-Protein, das mit vielen biologischen Prozessen wie z. B. Proliferation, Apoptose, Steroidgenese und Immunmodulation assoziiert ist und in verschiedenen Krebsarten gefunden wird, in vitro sensitiv mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert.^[267]

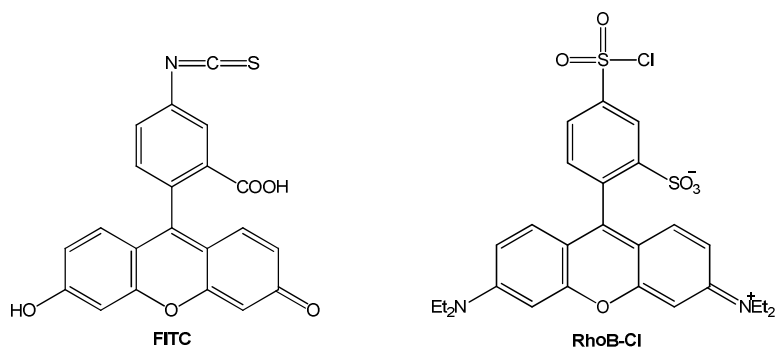


Abb. 55: Struktur von FITC und RhoB-Cl.

3.3.2. Synthese und CSS-katalysierte Aktivierung von Fluoreszenz-verlinkten Sialinsäuren

Für die Synthese von fluoreszenzmarkierten Sialinsäuren ist wegen der Vorbedingung ihrer weiteren enzymatischen Aktivierung und anschließendem Sialyltransfer zuerst zu überlegen, an welcher Position der Sialinsäuren ohne größeren Schaden (Aktivitätsverlust) eine kovalente Markierung angebracht werden darf, und mit welchen Konjugationsverfahren die Markierung leicht und effektiv durchführbar ist. Hierzu müssen zunächst die Strukturmerkmale einer Sialinsäure betrachtet werden. An C2 befindet sich die ionische C1-Carboxylatgruppe sowie die anomere C2-OH-Gruppe, die als Nucleophil für den Angriff auf das α -Phosphat des Nucleotids mechanistisch unabhängig ist. Deswegen darf diese Region auf keinen Fall tangiert werden. Die C3-Position kann wegen des Fehlens einer funktionellen Gruppe vernachlässigt werden. C4-OH sollte nicht verändert werden, da von Warwel im Arbeitskreis gezeigt wurde, dass z.B. *iso*-Neu5Ac (Abb. 56) kein Substrat der CSS ist,^[185] weswegen die enzymatische Aktivierung von C4-fluoreszenzmarkierter Sialinsäure vermutlich blockiert wird. Das C6 von Sialinsäuren entspricht der C3-Position der Vorläufer Man-/ManNAc; C3-OH ist als Nucleophil für die enzymatische Bildung der entsprechenden Sialinsäuren mit Hilfe der NeuA verantwortlich und scheidet daher ebenfalls für Konjugationen aus. Die benachbarten C7-OH und C8-OH entsprechen den C4- und C5-Positionen von Man/ManNAc, die die Vorstufen der entsprechenden Sialinsäuren sind. Die spezifische chemische Markierung von Sialinsäure bzw. der C4-/C5-Position von Man/ManNAc ist wegen der aufwendigen Schutz- und der selektiven Entschüttungsschritte unvorteilhaft. Außerdem können C4-modifizierte Man-/ManNAc-Derivate nach bisherigen Forschungsergebnissen (kein Umsatz von GlcNAc- β -1 \rightarrow 4-Man zu der entsprechenden Sialinsäure)^[69] möglicherweise nicht zu den entsprechenden Sialinsäuren umgewandelt

werden. C8-OH ist auch eine Akzeptorposition in der α 2,8-Sialyltransferreaktion. Zwei vernünftige Positionen zur Fluoreszenzmarkierung verbleiben an C5- und C9-Position. Das C5 der Sialinsäuren entspricht C2 in den Sialinsäurevorstufen, Man- oder ManNAc-Derivaten, die leicht und chemisch selektiv durch eine funktionelle Gruppe gekoppelt werden kann. Beispielsweise konnte die 2-Azido-mannose aus ManNH₂ mit Hilfe eines Azo-transfermittels (z.B. Trifluoromethansulfonylazid) quantitativ hergestellt werden,^[69, 78, 268] 6-Azido-Man (**132**) konnte aus Man durch selektive Tosylierung von primärer C6-OH und anschließender Substitution durch eine Azid-Gruppe erhalten werden (siehe Kap. 3.1.1). Die verschiedenen Azido-, Amin- oder Alkin-funktionalisierten N-Acyl-Gruppen an C2 von Man-/ManNAc-Derivaten, und sogar die fluoreszenzmarkierten ManNAc-Derivate (**154**, **155**) konnten durch Kupplungsreaktionen leicht hergestellt werden (siehe Kap. 3.1.1). Solche Man-/ManNAc-Derivate konnten tatsächlich enzymatisch zu den entsprechenden Sialinsäuren umgewandelt werden (siehe Kap. 3.1.2), die dann mit Hilfe verschiedener funktioneller Gruppen, wie z.B. terminale Alkin-, Azid- und Amin-Gruppen, unter milden Reaktionsbedingungen durch CuAAC- oder Staudinger-Reaktionen mit Chromophoren verknüpft werden können.

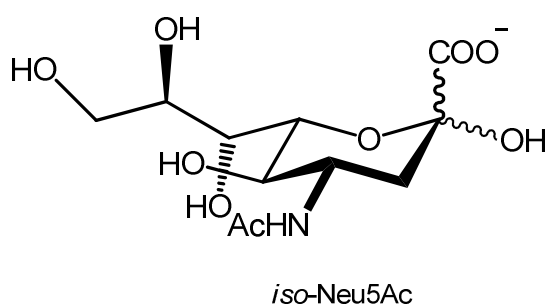


Abb. 56: Die Struktur der *iso-Neu5Ac*.

Um die Chromophor-markierten Sialinsäuren enzymatisch problemlos zu aktivieren und anschließend zu transferieren, muss noch überlegt werden, wie lang der Linker zwischen dem räumlich relativ großen Chromophoranteil und der Sialinsäure-Einheit sein soll. Vermutlich sollte der Linker länger als 3 Å sein bzw. besser aus einer gesättigten C-Kette bestehen, damit sich die Chromophore während der CSS-Aktivierungsreaktion flexibler orientieren können, so dass der große Chromophoranteil sich in bzw. außerhalb der CSS gut anpassen kann.

Um fluoreszenzmarkierte Sialinsäuren und die entsprechenden CMP-aktivierten Sialinsäuren herzustellen, mussten zuerst reaktionsfähige Fluoreszenzmarker synthetisiert werden. Als für

CuAAC-Kupplungen geeignete reaktive Gruppen kamen nur terminale Azid- oder Alkinfunktionen in Frage. Während Fluoreszein- bzw. Rhodamin-Kupplungskomponenten aus den kommerziellen Reagenzien FITC bzw. RhoB-Cl erzeugt werden können, bot sich für den Cumarintyp eher eine Neusynthese an.

Das 7-Diethylamino-3-azido-cumarin (**38**) (Abb. 57) wurde nach einem Literaturverfahren^[247] aus 4-Diethylamino-salicylaldehyd und Nitroacetat über zwei Zwischenprodukte **36** und **37** mit einer Gesamtausbeute von 69% erhalten.

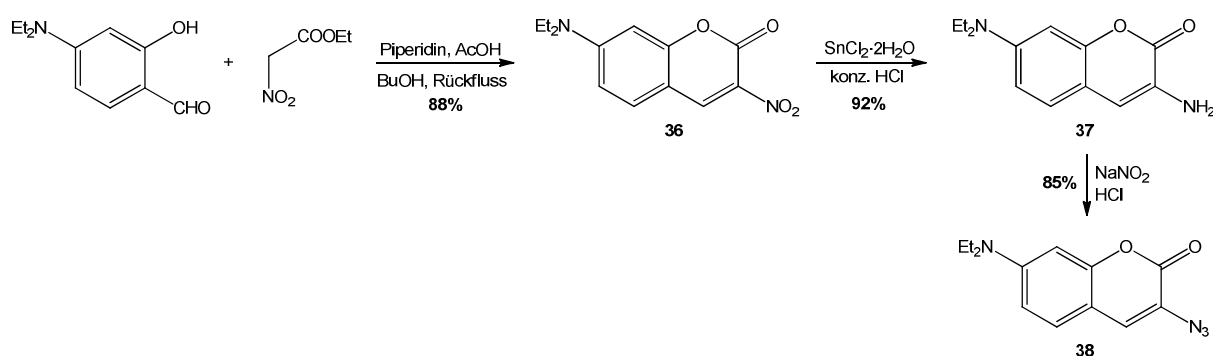


Abb. 57: Synthese von Azid-substituiertem Cumarin **38**.

Um die mit einer terminalen Alkingruppe gekoppelten Chromophore aus FITC bzw. RhoB-Cl zu erhalten, wird ein Amin-funktionalisierter Linker mit terminalem Alkin benötigt, damit das Alkin mit den Chromophoren über eine Amid-Kupplungsreaktion unter basischen Bedingungen leicht zu dem gewünschten Produkt (**5-7**) (Abb. 58) gekoppelt werden kann. Das für die Synthese von Produkt **7** benötigte Propargylamin ist kommerziell verfügbar, jedoch wurde 5-Amino-1-Pentin (**4**) für die Synthese der Alkin-gekoppelten FITC- bzw. Rhodamin-Derivate (**5** bzw. **6**) mit einem relativ längeren Linker wegen des höheren Preis (500 mg für 93€) während der Arbeit selbst hergestellt. Das 5-Amino-1-pentin (**4**) konnte ausgehend von 5-Iodo-pentin (**1**) sowohl mittels Staudinger-Reaktion^[269] über das Azid **2**, als auch mittels Gabriel-Synthese^[270] über das Phthalimid **3** hergestellt werden (Abb. 58). Wegen der problematischen Abtrennung des Phtalazin-Nebenprodukts war die Ausbeute bei der zweiten Methode geringer. Prinzipiell kann das Azid **3** direkt aus 5-Chlor-pentin nach Substitution von Chlor durch Azid synthetisiert werden. Jedoch wurde das Chlor-Atom in 5-Chlor-pentin zuerst durch die bessere Abgangsgruppe Iod-Atom substituiert, um die terminale Halogen-Postion durch die Azid-Gruppe effektiver zu tauschen.

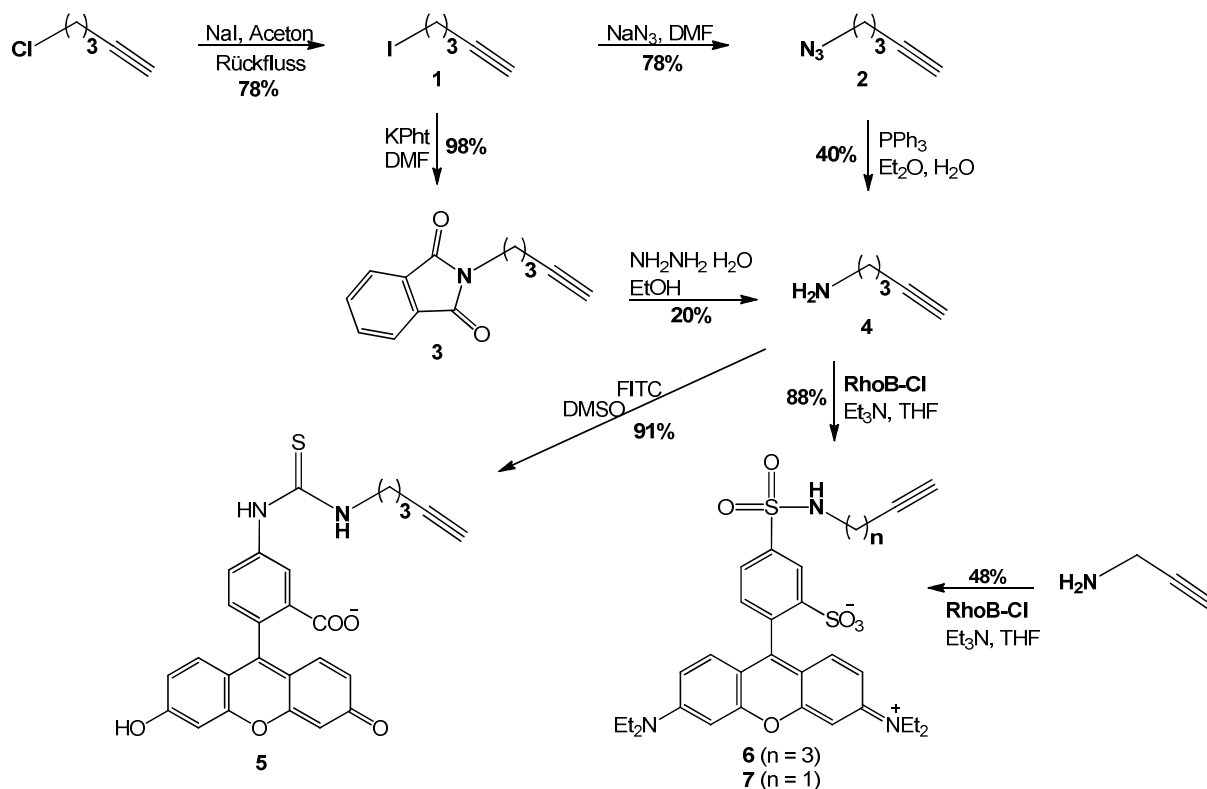


Abb. 58: Syntheseweg der Chromophore-Alkin 5 und 6/7.

Die mit dem Coumarin- (196, 197) oder Rhodamin-Fluorophor (198, 199) markierten Sialinsäuren wurden anschließend durch CuAAC-Reaktion, d.h. [2+3]-Cycloaddition^[271] mit Cu(I) als Katalysator, aus Neu5Hex (173) und den Azid-funktionalisierten Sialinsäuren (172, 178) synthetisiert. Katalytisch aktive Cu (I) wurde in situ durch Reduktion aus CuSO₄ mittels Natriumascorbat als Reduktionsmittel und Komplexbildner gebildet. Nach chromatographischer Aufreinigung über RP-C18-Kieselgel oder über Flash-Kieselgel wurden die Verbindungen in moderaten bis guten Ausbeuten in reiner Form isoliert (Abb. 59).

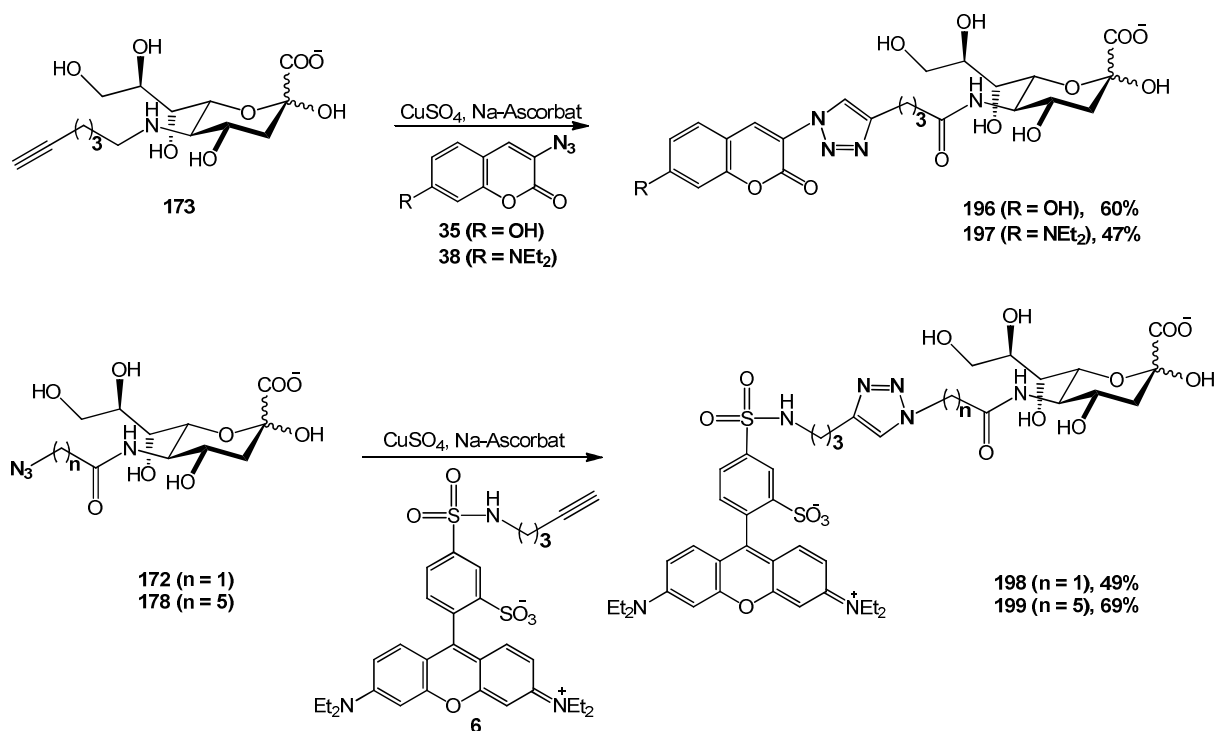


Abb. 59: Synthese von fluoreszenzmarkierten Sialinsäuren durch Click-Reaktion.

Die an der C5-Position mit Fluoreszein gekoppelte Sialinsäure **200** wurde unter mildbasischen Bedingungen in NaHCO_3 -Lösung (0.15 M, $\text{pH} = 9.0$) aus der entsprechenden Amino-Sialinsäure **187** durch die Addition von kommerziellem FITC hergestellt (Abb. 60). Das Produkt wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie mit $n\text{-BuOH/Aceton/AcOH/H}_2\text{O}$ (35/35/7/23) als Laufmittel aufgereinigt und dann durch ESI-MS-Spektroskopie detektiert. Alle Arbeiten wurden unter Lichtausschluss durchgeführt, um ein Ausbleichen des Farbstoffs in Gegenwart von Sauerstoff zu verhindern.

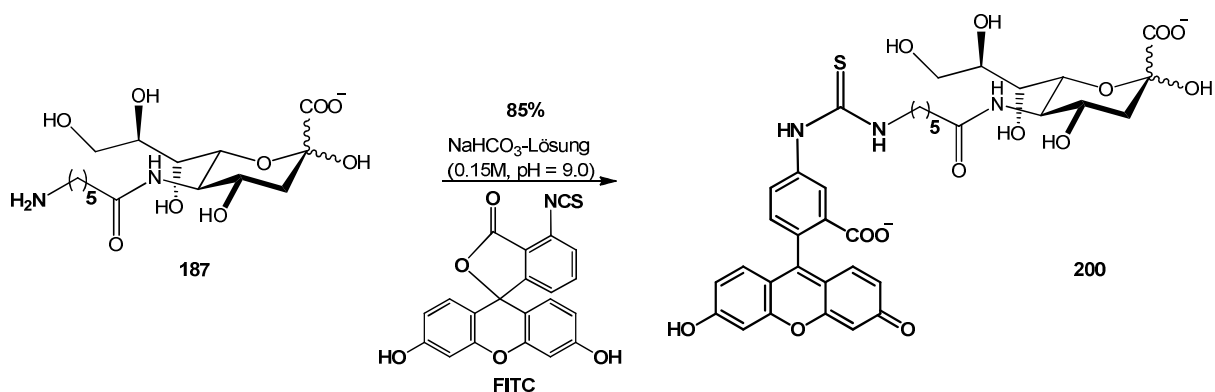


Abb. 60: Synthese der Fluoresceinyl-Sialinsäure **200**.

Mit der Verfügbarkeit der verschiedenen Chromophor-verlinkten Sialinsäuren war der nächste entscheidende enzymatische Schritt, die Aktivierung der Sialinsäuren durch CSS gefragt. Vor einer kritischen enzymatischen Aktivierung der mit einem Chromophor gekoppelten Sialinsäuren wurde zuerst eine relativ sichere Synthesemethode, die Click-Cycloaddition aus der CSS-aktivierten Verbindung CMP-Neu5Hex (**208**) mit Cum-OH (**35**) und Cum-NEt₂ (**38**), zur Herstellung der mit Cumarin gekoppelten CMP-aktivierten Sialinsäuren **217** und **218** (Abb. 61) verwendet. Die beiden gebildeten Produkte **217** und **218** konnten mittels ESI-MS eindeutig bestätigt werden. Jedoch waren die durch Click-Reaktion hergestellten Produkte **217** und **218** wegen der inhibitorischen Eigenschaften von Kupfersalzen für enzymatische Folgereaktion erst nach einer chromatographischen Aufreinigung über Kieselgel für die geplanten Sialylierungen verwendbar. Andererseits erwiesen sich **217** und **218** im Vergleich zu den durch Click-Addition gebildeten Zwischenprodukten Sia-Cum-OH **196** und Sia-Cum-NEt₂ **197** viel empfindlich gegenüber pH-Wert-Änderungen und führten wegen ihrer Instabilität bei der Aufreinigung durch Säulenchromatographie zu Substanzverlusten.

Daher wurden die Cumarin-gekoppelten Sialinsäuren **196/197** als nächstes in die CSS-Aktivierungsreaktion eingesetzt, um die Produkte **217/218** alternativ direkt enzymatisch zu synthetisieren (Abb. 61). Mittels DC-Kontrolle (Vergleich der Reaktionsmischung mit reinen Produkten **217/218** aus der Click-Addition) und anschließender ESI-MS-Analyse konnte eine praktisch quantitativ verlaufende Umsetzung beobachtet werden. Außerdem konnten die auf diesem Weg hergestellten Produkte **217** und **218** ohne weitere chromatographische Aufreinigung direkt als Substrat für nachfolgende Studien zum präparativen Sialyltransfer *in vivo* oder *in vitro* verwendet werden. Daher ist diese direkt enzymatische Aktivierung von **196/197** gegenüber dem Synthesewege über Click-Additionen klar im Vorteil und wurde für weiterführende Studien bevorzugt.

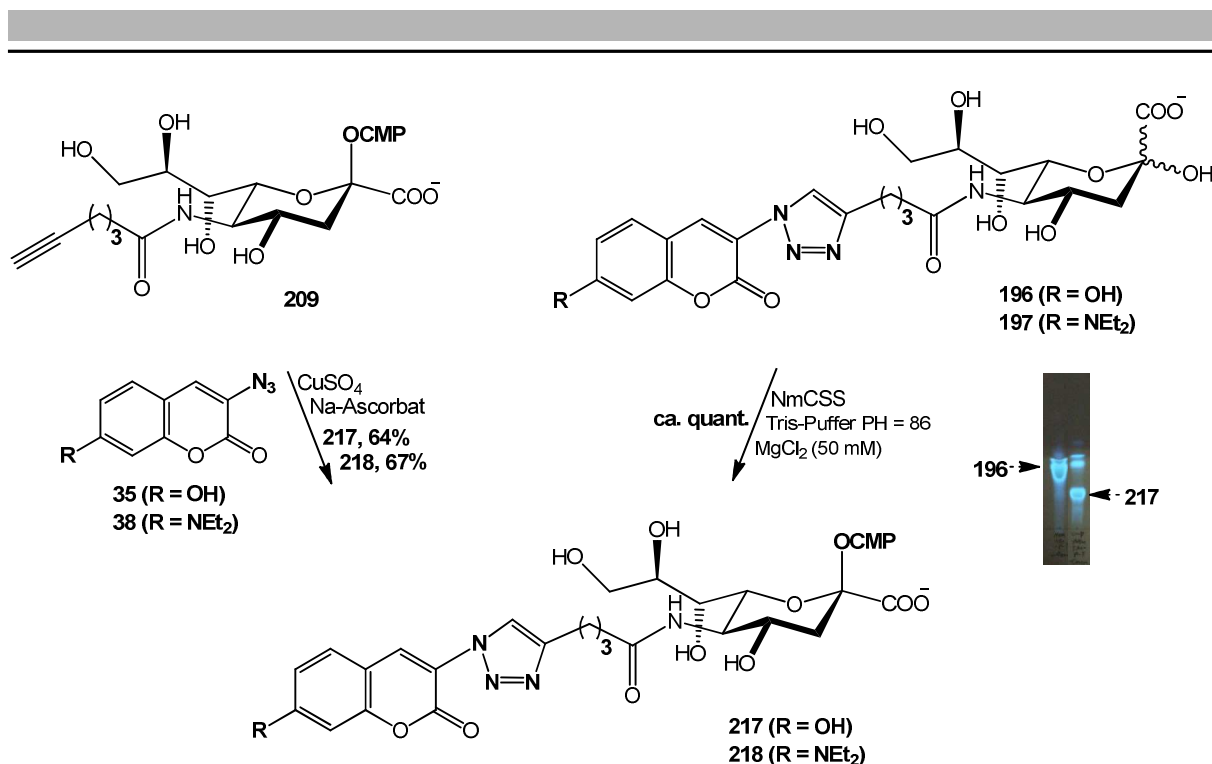


Abb. 61: Synthese der mit Cumarin gekoppelten Sialinsäuren **217** und **218**.

Interessanterweise konnte die Rhodamin-gekoppelte Sialinsäure **198** nicht durch die NmCSS zu dem entsprechenden Konjugat **219** aktiviert, sondern nur durch chemische Synthese über die Click-Reaktion von CMP-Neu5AcN₃ (**207**) mit dem Rhodamin-Pentin (**6**) erhalten werden (Abb. 62). Leider wurde das Produkt **219** während der notwendigen Aufreinigung durch Säulenchromatographie wegen seiner Instabilität gegenüberdem mildsauren Kieselgel wieder hydrolytisch zum Edukt **198** zersetzt. Das unerwartete Ausbleiben der CSS-Aktivierung von **198** war vor dem Hintergrund der erfolgreichen Aktivierung von **196/197** zunächst überraschend, weil alle Komponenten einen sterisch sperrigen aromatischen Chromophor in ähnlicher Distanz zum Sialylfragment aufweisen. Im Vergleich mit Sia-Cum **196** oder **197** ist die Kette zwischen Chromophor und Sialinsäure bei **198** nur wenig kürzer, jedoch ist die Rhodamin-Gruppierung geladen und größer als das Cumarin. Andererseits ist die Position des Triazolrings in **198** nur durch eine Methyleinheit von der Amidkupplung entfernt, während die Distanz in **196/197** drei CH₂-Einheiten beträgt, darüberhinaus ist der Triazolring invers mit den Komponenten substituiert. Deswegen wurden alternativ die mit Rhodamin und FITC markierten Sialinsäuren **199** und **200** hergestellt, die einen mit 5 C-Atomen deutlich verlängerten Methylen-Linker zwischen Chromophor und Sialinsäure enthalten. Die Aktivierung von **199** und **200** mit Hilfe der CSS wurde mittels DC kontrolliert und tatsächlich konnte bereits nach einer Stunde rascher Umsatz beobachtet werden (Abb. 63).

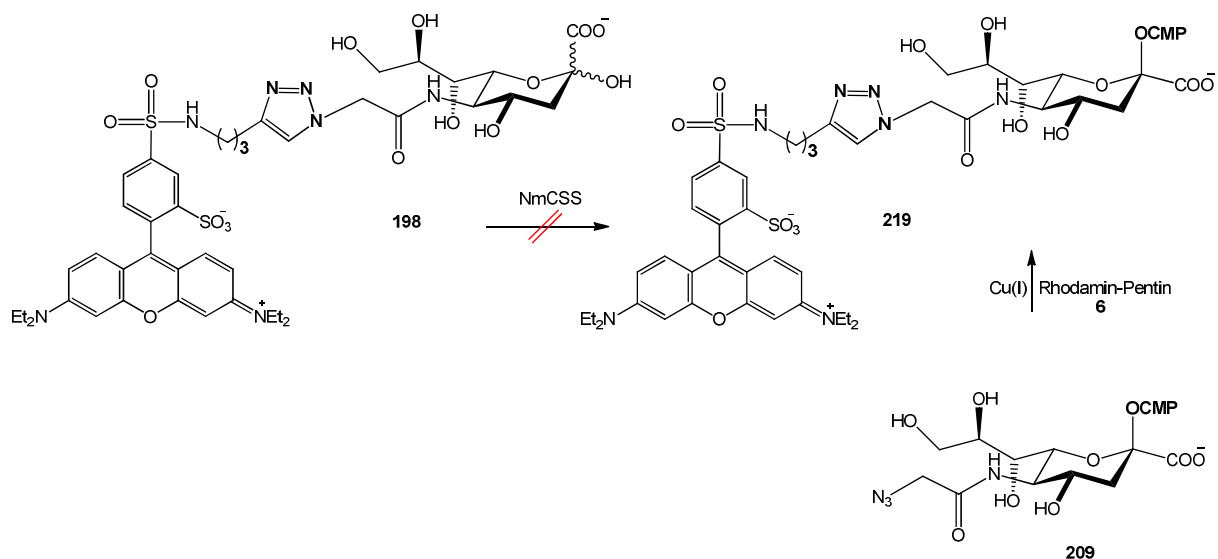


Abb. 62: Syntheseweg von Fluoreszenz markierter CMP-Sialinsäure **219**.

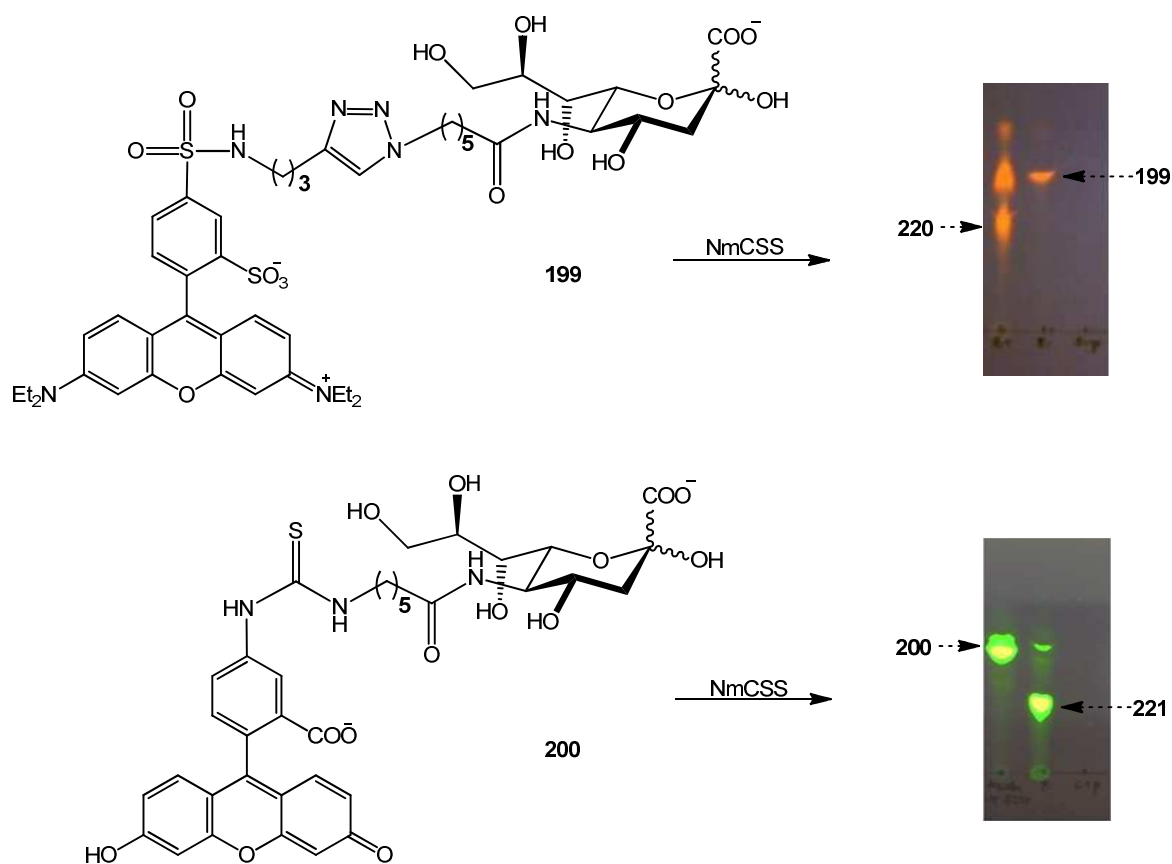


Abb. 63: Aktivierung der Sialinsäuren **199** und **200** durch NmCSS.

3.3.3. Synthese vielseitig verwendbarer Sialylakzeptoren

Chemische Synthese von Acridon-knüpften Glycosylakzeptoren

Fluoreszenzchromophore werden höchst erfolgreich beim Nachweis sowie bei der Charakterisierung und Lokalisierung von Kohlenhydraten, Phospholipiden, Proteinen, Oligonucleotiden sowie zahlreichen anderen synthetischen und natürlich vorkommenden Verbindungen eingesetzt. Bei der enzymatischen Synthese von Oligosacchariden bzw. beim Substratscreening von Glycosyltransferasen erleichtert ein fluoreszenzmarkiertes Substrat die Reaktionsverfolgung. So könnte ein Sialyltransfer mit den wertvollen CMP-Donorsubstraten und einer markierten Akzeptorverbindung bereits im Sub-Mikromaßstab getestet werden, bevor eine präparative Synthese durchgeführt wird. Für diesen Aspekt wurden in der Vergangenheit geeignete Akzeptoren verwendet, die mit Fluorescein-,^[272] Rhodamin-,^[273-276] Dansyl-,^[277] 3-Azido-7-hydroxycumarin- (35)^[278] und 10*H*-Acridin-9-on- (Acridon (26))^[68, 69]-Resten markiert waren, um Galactosyl-, Sialyl-, und Fucosyltransferase- bzw. Chitinsyntasereaktionen hoch empfindlich verfolgen zu können. Im Vergleich zu Fluorescein, Dansylamid oder Cumarin (35) ist Acridon chemisch hoch stabil und kommerziell in größerem Maßstab verfügbar bzw. kann aus preiswerten Grundchemikalien leicht synthetisiert werden.^[165] Bisher wurden Acridon und seine Derivate wegen ihrer hohen Resistenz gegen Photobleaching^[279] und der hohen Fluoreszenzquantenausbeute als Fluoreszenzchromophore für das Screening katalytischer Antikörper^[280] und die Detektion von DNA^[281-283] verwendet. Im medizinischen Bereich finden Acridonalkaloide Verwendung als Medikamente gegen Krebs^[284, 285] und Malaria^[286] bzw. sind als wirksame und reversible Inhibitoren von Cathepsin V^[287] geeignet. Außerdem konnte Acridon aufgrund seiner hydrophoben Aromaten-Struktur als Anker für reversible Festphasensynthese verwendet werden, die von AK Fessner erstmals entwickelt wurde.^[288]

Acridon besitzt wegen der koplanaren Aromaten-Struktur eine exzellente Quantenausbeute, hohe chemische und photochemische Stabilität und damit vor allem im Vergleich zu Dansylamiden und Fluoresceinkonjugaten in der DC-Analytik eine für unterschiedliche Auge deutlich niedrigere Nachweisgrenze von 1 pmol/L bei Anregung mit einer Wellenlänge von 254 nm. Damit kann der Reaktionsverlauf mit Hilfe von Acridon-Derivaten in enzymatischen Reaktionen, wie z.B. der Synthese von Sialokonjugaten, bei geringsten Substanzmengen schnell und effektiv mittels DC verfolgt werden.

Außerdem besitzt Acridon noch einen Selektivitätsvorteil, weil die hydrophoben Eigenschaften des Aromaten eine reversible Bindung von Acridon-gekoppelten Substraten an RP-C₁₈-Kieselgel über *van-der-Waals*-Kräfte ermöglichen, während typische weitere ionische oder polare (bio)chemische Reagenzien in wässriger Lösung verbleiben. Durch Zugabe von Wasser wird die hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Acridon-Substratmolekülen und der Festphase verstärkt, und erst nach Trennen löslicher Verunreinigungen werden die Materialien wieder durch Zugabe organischer Solventien selektiv abgelöst (Abb. 64). Nach diesem Prinzip können auch mit Acridon verlinkte Saccharide nach der enzymatischen Synthese mittels RP-C18-Kieselgel durch einfaches Nachspülen mit Wasser von wasserlöslichen Nebenprodukten sowie Edukten getrennt und anschließend durch Elution mit polaren organischen Lösemitteln wie MeOH in reiner Form eluiert werden.

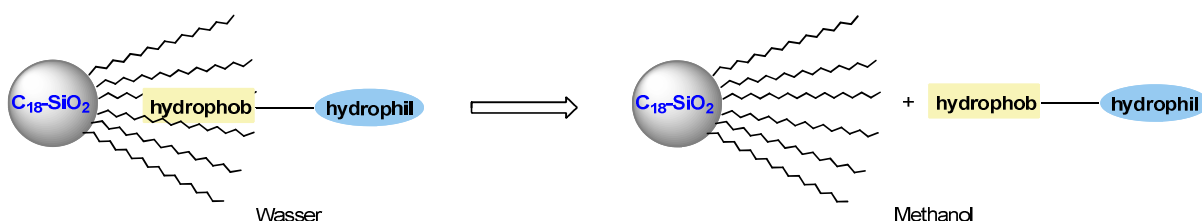
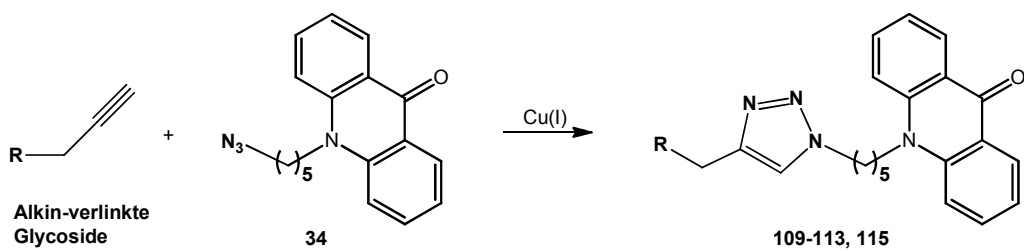


Abb. 64: Reversible hydrophobe Adsorption.

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene mit Acridon gekoppelte Glycoside chemisch synthetisiert. Um eine ausreichende sterische Flexibilität zu gewährleisten und somit die Substrate den Bedürfnissen der Glycosyltransferasen gut anzupassen, wurde der Acridon-Marker über einen Spacer an den Zucker gebunden. Durch Click-Reaktion wurden die jeweils mit Acridon-markierten Verbindungen β -2-*N*-Acetylglucosid (**109**), α/β -Glucosid (**110/111**), α/β -Galactosid (**112/113**) bzw. β -Lactosid (**115**) aus den entsprechenden ungeschützten Alkynyl- α/β -Glycosiden **45**, **54**, **56**, **57**, **59** und **102** mit Acridinon-pentyl-azid (**34**) unter Cu(I)-Katalyse in einem Lösungsmittelgemisch aus EtOH und H₂O hergestellt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Synthese der mit Acridon gekoppelten Glycoside mittels Click-Reaktion.



Alkin-verlinkte Glycoside	R	Produkt	Ausbeute
45		109	56%
54		110	46%
56		111	46%
57		112	63%
59		113	74%
102		115	75%

Die Alkynyl-Glycoside Glc- α -Prop (**54**) und Gal- α -Prop (**57**) wurden aus Glucose und Galactose mit Propargylalkohol durch Fischer-Glycosylierung mittels TMSCl^[289] oder saurem Ionenaustauscher^[290] als Katalysator oder mit Hilfe von H₂SO₄-Kieselgel^[291, 292] als effektivem Promotor hergestellt. Die Abtrennung der α -Produkte aus dem entstehenden α/β -Anomerengemisch durch Säulenchromatographie war nicht ohne größeren Aufwand erreichbar, da bei Versuchen zur Aufreinigung nur viele Mischfraktionen mit unterschiedlichem α/β -Gehalt resultierten. Eine alternative Methode für die Entfernung der β -Anomer-Nebenprodukte ist ihre enzymatische selektive Zersetzung durch eine spezifische β -Glycosidase^[293], wodurch **54** und **57** jeweils in reiner α -Form erhalten wurden.

Für die Herstellung der Acridon-gekoppelten α -Glycoside (**110** und **112**) konnten nicht nur die reinen α -Propargyl-glycoside, sondern auch die α/β -Gemische direkt als Ausgangsmaterial in den Click-Reaktionen eingesetzt werden. Die β -Produktanteile der gebildeten α/β -gemischten fluoreszenzmarkierten Glycoside konnten durch β -Glucosidase bzw. β -Galactosidase enzymatisch hydrolytisch gespalten werden, worauf die reinen α -Glycoside aus den Anomermischungen rein isoliert werden konnten, wie z.B. Gal- α -T-P-Acr (**112**) aus Gal- α/β -T-P-Acr. Dies beweist, dass die mit Acridon verlinkten Glycoside auch Substrate für Glycosidasen sein können, und ermöglicht die Entwicklung einer Fluoreszenz-basierten Assay-Methode für Glycosidase-Aktivität. Für die präparative Synthese von fluorensenzmarkierten α -Glycosiden ist diese Methode jedoch ungünstiger, da kostbares Acr-P-N₃ (**34**) durch die enzymatische Hydrolyse der β -Produkte teilweise unnütz verbraucht wird, was den Wegfall der Isolierung der α -Propargyl-glycoside aus den entsprechenden Anomermischungen nicht wirklich ökonomisch rechtfertigen kann.

Das für die Herstellung von Acridon-gekoppeltem β -Lactosid (**115**) benötigte Alkynyl-Lactosid **102** konnte ähnlich der Synthese von Glc- β -Prop (**56**)^[294] und Gal- β -Prop (**59**)^[294] durch Glycosylierung aus peracetyliertem Lactosid (**LacAc₈**) als Glycosyldonor und dem entsprechenden Alkohol (**12**)^[295] in Gegenwart von BF₃-Et₂O als Lewis-Säure mit anschließender Entschützung (NaOMe in MeOH) in guter Ausbeute hergestellt werden (Abb. 65). Im Vergleich zur *Helferich*-Methode^[69, 170] ist dieser Syntheseweg wegen der Vermeidung einer separaten Synthese von peracetyliertem Glycosyl-bromid, milden Reaktionsbedingungen bzw. besserer Ausbeute bevorzugt. Das Aminosackerglycosid GlcNAc- β -Prop (**45**), die korrespondierenden Ausgangsverbindung von GlcNAc-T-P-Acr (**109**), konnte nach *Vauzeilles et al.*^[296] direkt aus ungeschütztem *N*-Acetyl-glucosamin und Propargylbromid durch Behandlung mit LiBr/NaH mit einer guten Ausbeute von 88% synthetisiert werden.

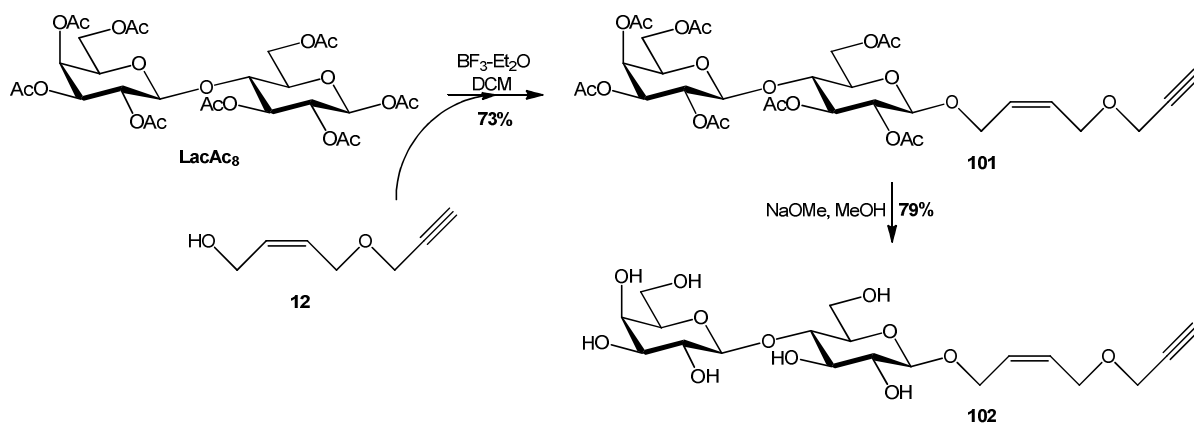


Abb. 65: Synthese des Alkynyl-Lactosids **102**.

Die Glycosylierung der triazolfreien Acridon-markierten Glycosiden (Abb. 66), GlcNAc-P-Acr (**104**), Lac-P-Acr (**105**) oder Lac-D-P-Acr (**107**) wurde mittels der Oxazolin-Methode^[297] mit wasserfreiem CuCl_2 als Katalysator aus dem Oxazolin (**43**) bzw. mittels dem Trichloracetimidat-Verfahren^[177] mit AgOTf als Promotor aus Lactosyl-trichloracetimidat (**51**) als Glycosyl-Donor mit dem jeweils entsprechenden Glycosylakzeptor-Alkohol (**29-30**) und anschließender Entschützung (NaOMe in MeOH) mit guten Gesamtausbeuten durchgeführt.

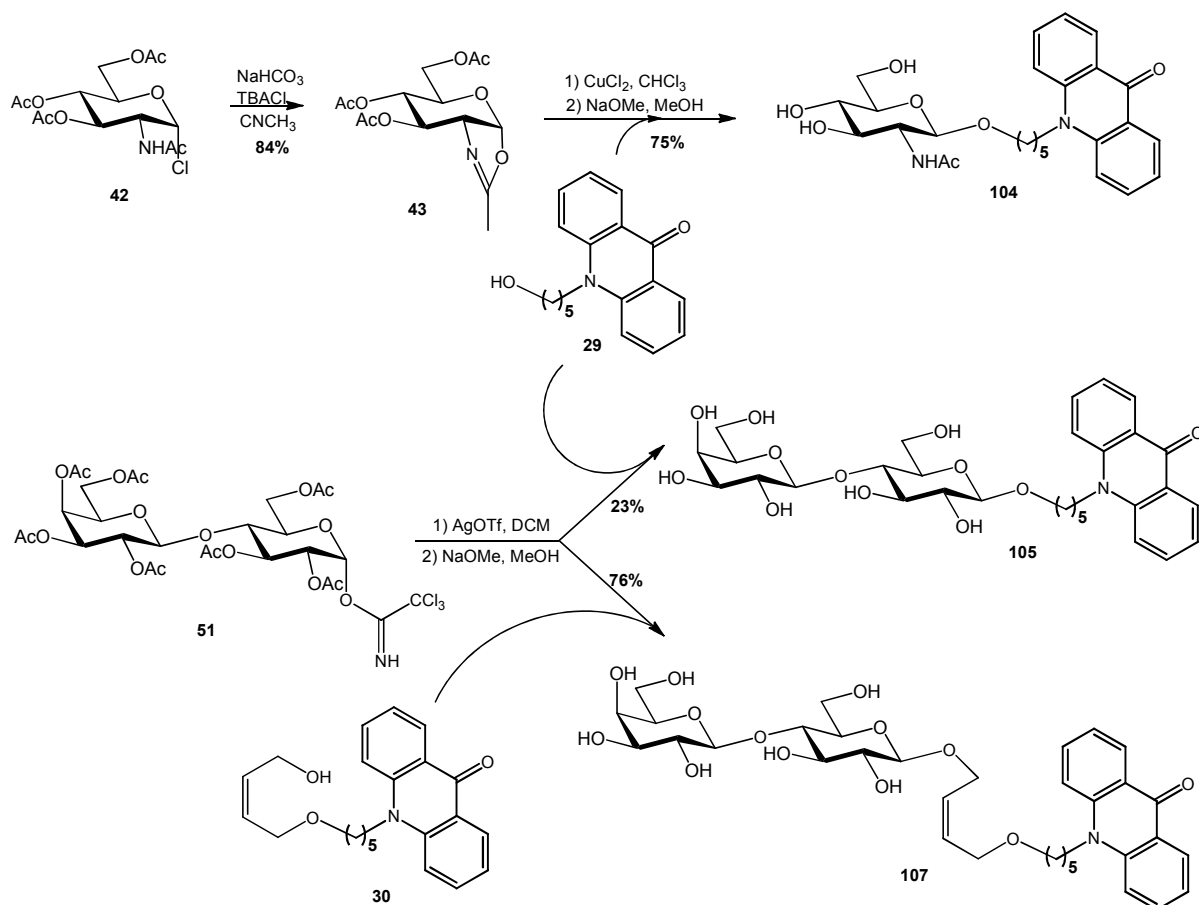


Abb. 66: Synthese von Triazol-freien Acridon-markierten Glycosiden.

Für die Herstellung der Acridon-gekoppelten Linkerelemente waren zwar zur Zeit bereits Synthesevorschriften im Arbeitskreis entwickelt worden, jedoch mussten im Hinblick auf möglicherweise umfangreichere Nutzung im Substratscreening der enzymatischen Oligosaccharidsynthese effizientere Routen erprobt werden.

Die Herstellung des Azids Acr-P-N₃ (**34**) wurde durch Azidsubstitution aus Acr-P-Br (**27**) mit NaN₃ unter Verwendung von Bu₄NBr als Phasentransferkatalysator in DMF/H₂O und anschließender Kristallisation aus Essigester mit einer sehr guten Ausbeute von 84% erreicht (Abb. 67). Zwei Wege waren für die Synthese von Acr-P-Br (**27**) ausgearbeitet worden, einmal durch Alkylierung von Acridon (**26**) unter Phasentransferbedingungen in 50%iger NaOH und THF unter Rückfluss^[69, 164] oder alternativ durch Deprotonierung mittels NaH in DMF und anschließender Alkylierung mit Hilfe von KI bei RT.^[282] Auf Grund der mildereren Reaktionsbedingungen und der vollständigen Umsetzung wurde die zweite Methode ausgewählt. Die Aufreinigungsprobleme für das Bromid **27** liegen darin, dass das hochsiedende überschüssige Edukt 1,5-Dibrompentan nicht über Extraktion oder durch milde

Destillation aus der Reaktionsmischung entfernt werden kann, und eine teilweise Zersetzung von **27** während der Säulenchromatographie über Kieselgel beobachtet wurde. Durch Kristallisation von **27** aus n-Pentan-Lösung konnten diese Probleme umgangen und das Bromid in Reinform rasch in guter Ausbeute erhalten werden.

Der Acridon-markierte Alkohol **29** als Glycosylakzeptor wurde ebenfalls aus Acr-P-Br (**27**) durch nucleophile Substitution hergestellt (NaOAc, 60 °C; Entschützung mit NaOMe/MeOH). Durch Williamson-Ethersynthese konnte Acr-P-D-OH (**30**) bzw. Acridon-markiertes Alkin (**33**) aus **27** über die deprotonierten Alkohole (NaH oder NaOH) synthetisiert werden (Abb. 67).

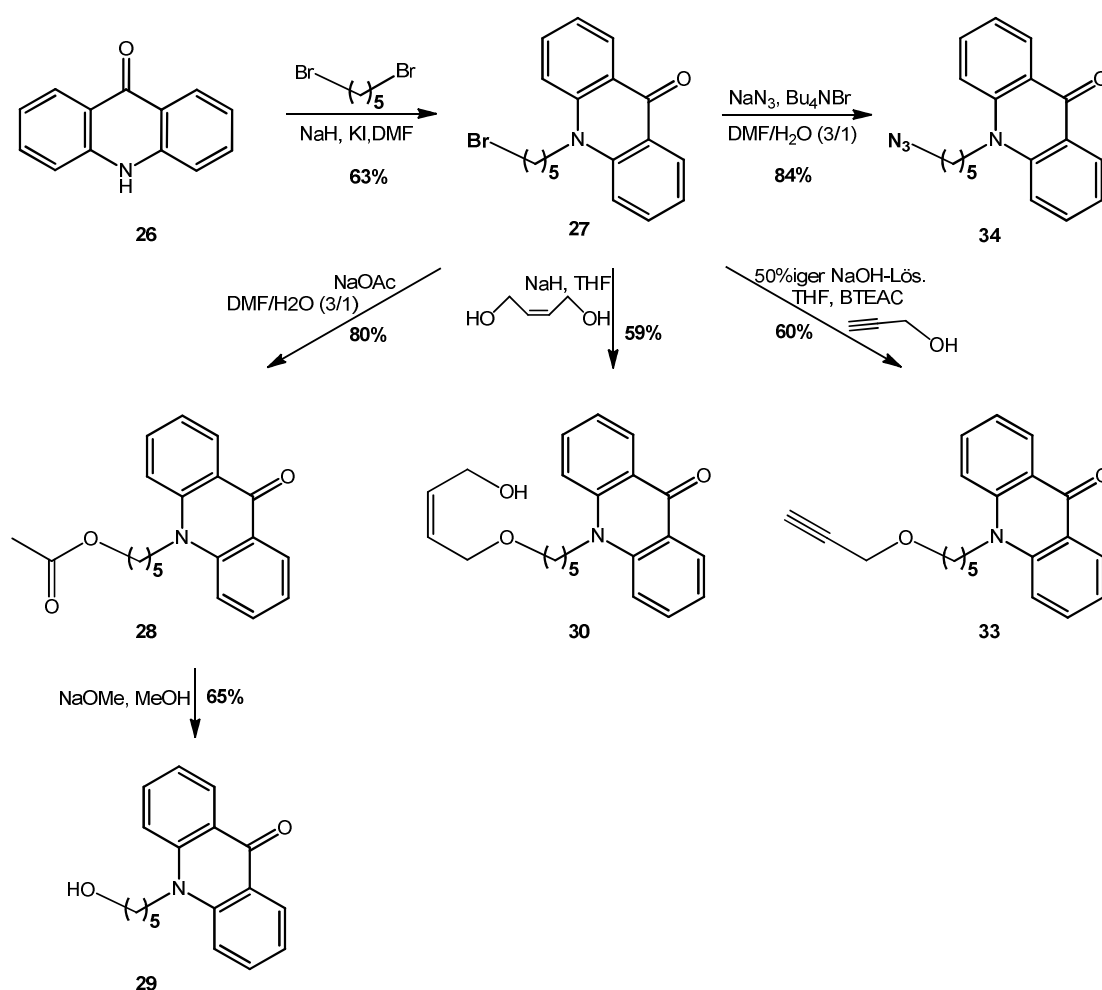


Abb. 67: Herstellung der Acridon-markierten Linker. (Alkohole **29/30**, Alkin **33**, Azid **34**)

Die Acridon-markierten Galactoside (**112** und **113**) bzw. die Lactoside **105**, **107** und **115** sind geeignet, als Akzeptoren für Sialyltransferasen eingesetzt zu werden. Insbesondere Lac-P-Acr

(105) und Lac-D-T-P-Acr (115) haben sich im Test-Sialyltransfer für die Detektierung der verschiedenen CMP-Sialinsäuren als auch für die präparative Synthese von verschiedenen fluoreszenzmarkierten Sialokonjugaten bewährt (siehe Kapitel 3.3.4). Die Doppelbindung in 115 wurde speziell für weitere Nutzungsaspekte eingeführt, weil sie selektiv mittels Ozonolyse zu den Aldehyd-funktionalisierten Zuckern gespalten werden könnte, um neuartige Glycoproteine durch die Umsetzung von Aldehyd mit funktionellen Gruppen von Proteinbausteinen herzustellen, bzw. weil Allylglycoside unter milden Bedingungen zu enolischen Glycosiden isomerisiert und dadurch leicht zu den am anomeren Zentrum freien Glycosiden hydrolysiert werden können.

Acridon-markierte GlcNAc-Glycoside 104 und 109 wären die Vorstufen der entsprechenden LacNAc- oder Lacto-*N*-biose-Derivate (Gal- β -1,3-GlcNAc- oder LNB-), einem speziellen Typ von Sialyltransferase-Akzeptoren. Aus einer vorherigen Arbeit^[298] ist bekannt, dass GlcNAc- α -T-P-Acr (109a) und GlcNAc- β -L-Acr (109b) (Abb. 68) gute Akzeptorsubstrate der β -1,4-Galactosyltransferase sind, so dass die entsprechenden LacNAc-glycoside aus GlcNAc- β -P-Acr (104) oder GlcNAc- β -T-P-Acr (109) durch Galactosyltransfer mit UDP-Galactose als Donor hergestellt werden könnten. β 1,4-Galactosyltransferase aus Kuhmilch ist kommerziell verfügbar und katalysiert den β -selektiven Galactosyltransfer von teurer UDP-Galactose, die in situ durch UDP-Galactose-4-epimerase aus günstigerer UDP-Glucose enzymatisch äquilibriert werden kann, auf die 4-Position eines GlcNAc-Teils unter Bildung einer Gal- β -1,4-GlcNAc- (LacNAc-) Struktur (Abb. 68), die weiter zur Synthese von Sialooligosaccharide mittels Sialyltransfer verwendet wurden.^[68, 299] Alkalische Phosphatase (CIAP) dient zur Zersetzung des bei der Reaktion entstehenden Inhibitors UDP zu Uridin und Phosphat (Abb. 68).

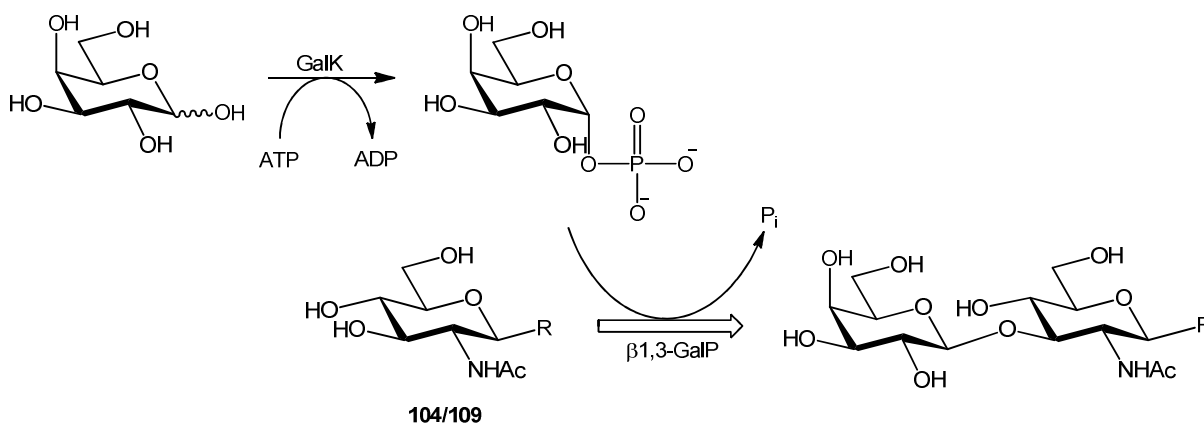


Abb. 69: Galactosylierung durch β 1,3-Galactosylphosphorylase.

3.3.4. Synthese neuartiger Sialokonjugate

Um die enzymatische Übertragung einer Sialinsäure auf einen geeigneten Sialylakzeptor zu erreichen, benötigt man eine passende Sialyltransferase. Im Arbeitskreis wurden bereits zwei Sialyltransferasen, eine α 2,3-SiaT aus *Campylobacter jejuni* (CstII Gen minus 32 C-terminale Aminosäuren, CstII Δ 32)^[127] und eine α 2,6-SiaT aus *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145 (ohne die 15 N-terminalen Aminosäuren)^[138] in *E.coli* BL21 (DE3) bzw. BL21 TunerTM exprimiert und in großem Maßstab produziert. Mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) wurden diese Enzyme über Ni^{2+} -Sephrose aufgereinigt und konnten für die präparative Synthese verschiedener neuartiger Sialooligosaccharide verwendet werden.

Synthese von α 2,3/8-Sialosiden mit Hilfe der α 2,3-Sialyltransferase CstII Δ 32

Die α 2,3-SiaT aus *Campylobacter jejuni* (CstII Gen aus Bakterienstamm OH₄₃₈₃) ist bifunktionell, d.h. es konnte gezeigt werden, dass sie neben der α 2,3- auch eine zusätzliche α 2,8-Sialyltransferase-Aktivität hat. Dadurch können die entstehenden α 2,3-Sialoside weiter als neue Akzeptoren für einen darauffolgenden zweiten Transfer-Schritt zur Synthese eines Produkts wie z.B. α 2,8Sia- α 2,3-Sia-Gal verwendet werden.^[122] Die Kristallstruktur dieses Enzyms wurde von Chiu *et al.* sowohl in Anwesenheit von CMP, als auch mit dem inerten Donor-Substratanalogon CMP-3-Fluoro-N-Acetylneuraminsäure als Liganden im aktiven Zentrum bestimmt,^[127] um den Katalysemechanismus des Sialyltransfer-Prozess besser verstehen zu können, bzw. um die strukturelle Basis für den Aufbau neuartiger

antibakterieller Wirkstoffe zu schaffen. Durch die Punktmutation I53S konnte die α 2,8-Sialyltransferase-Spezifität in der α 2,3-SiaT aus *Campylobacter jejuni* (CstII Δ 32 Gen) effizient gesteigert werden.^[305] Bisher wurde die Enzymform α 2,3/8-SiaT (CstII Δ 32) unter anderem in Kombination mit einer GalT für die Synthese von Ganglio-Oligosacchariden GD3 verwendet^[142] und die Mutante CstII Δ 32^{I53S} wurde aufgrund ihrer besonders hohen α 2,8-Sialyltransferase-Aktivität für die Herstellung von natürlichen und nicht-natürlichen Sialinsäure-haltigen Disialyl-^[146] oder Polysialyl-Oligosacchariden^[306] verwendet.

In eigenen Studien wurden verschiedene fluoreszenzmarkierte α 2,3- und α 2,3-/ α 2,8-Sialooligosaccharide durch Verwendung der α 2,3-SiaT (CstII Δ 32) hergestellt. Neu5Ac (**160**) wurde in situ durch die CSS unter Verbrauch von CTP aktiviert und durch die α 2,3-SiaT auf das Acridon-markierte Lactosid **105/115** als Akzeptor übertragen. Wegen der Bifunktionalität der α 2,3-SiaT (CstII Δ 32) wurden dabei nicht nur Monosialyl- (**230/232**), sondern auch Disialyl-Oligosaccharide (**231/233**) erhalten, wobei der Produktanteil an Disialyl-Oligosacchariden **231** bzw. **233** durch die Steigerung der eingesetzten Neu5Ac-Menge erhöht werden konnte. Nach der Ein-Topf-Reaktionsstrategie wurden **230/232** bzw. **231/233** nur mit Ausbeuten von 44%/57% bzw. 4%/32% produziert, was bei nicht vollständig verlaufenden Umsetzungen vermutlich der zunehmenden Konzentration des inhibitorischen Begleitprodukts CMP angelastet werden muss (Abb. 70).

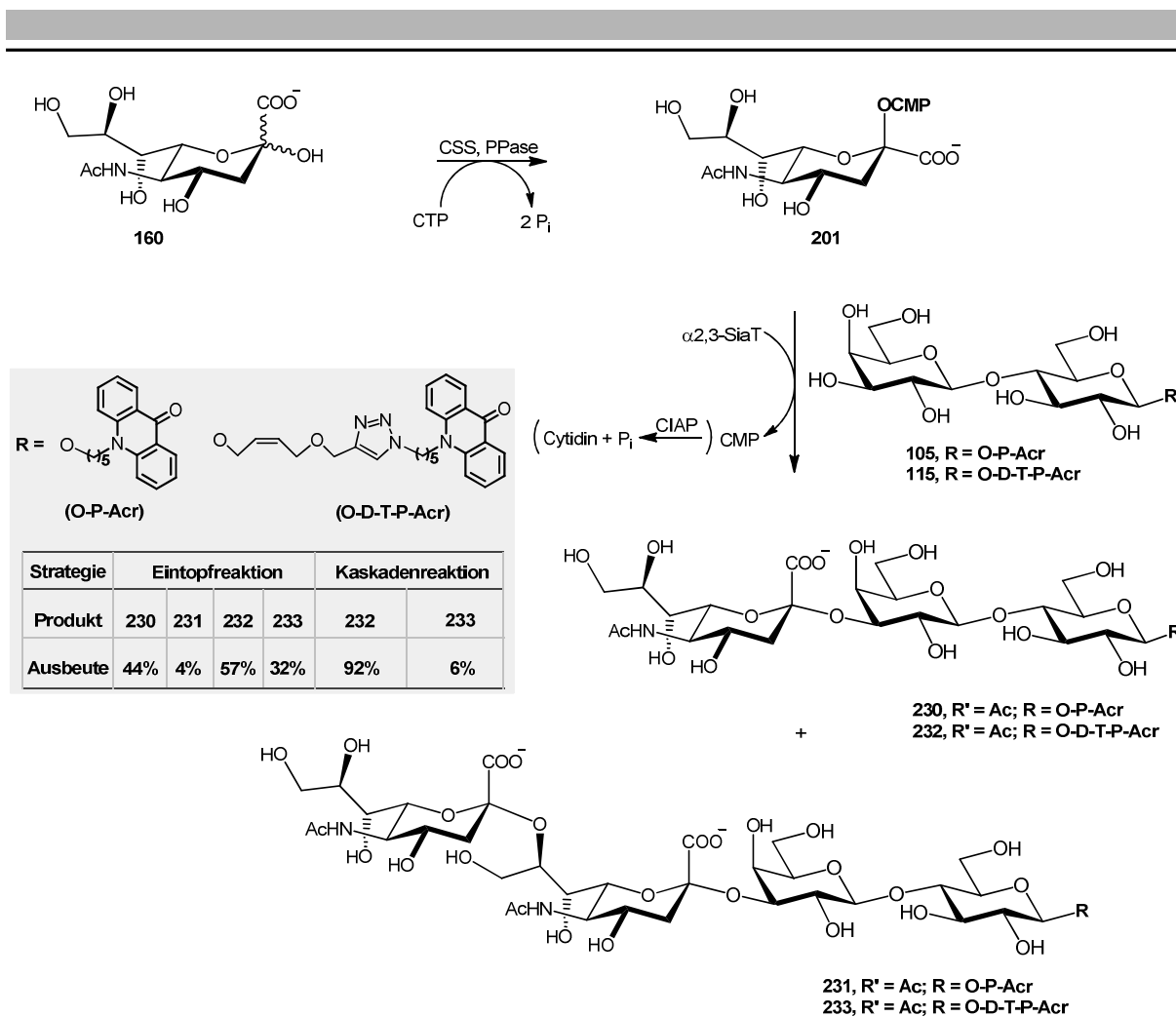


Abb. 70: $\alpha 2,3/8$ -Sialyltransfer in der Eintopfreaktion ohne Verwendung von CIAP oder Kaskaden-Reaktion mit CIAP.

Eine schnellere und vollständige Umsetzung von Sialinsäuren zu den entsprechenden Sialokonjugaten konnte nach Ablauf der CMP-Aktivierung durch Zugabe von kommerzieller alkalischer Phosphatase (CIAP) mit der SiaT erreicht werden, da die CIAP das in der Sialyltransfer-Reaktion entstehende CMP zum nicht-inhibierenden Cytidin und Phosphat zersetzt.^[109, 307] Diese niedermolekularen Komponenten lassen sich durch Chromatographie über BioGel P2 oder RP-C18-Kieselgel auf einfache Weise von den gebildeten Glycokonjugaten abtrennen. Jedoch konnte die CIAP deshalb nicht im Ein-Topf-, sondern nur in einem Kaskaden-Reaktionssystem eingesetzt werden, weil sie ansonsten CTP zerstören würde. Durch die Zugabe von CIAP konnte beispielsweise die isolierte Ausbeute des Sialosids **232** auf 92% gesteigert werden (Abb. 70). Deswegen wurde diese Kaskaden-Strategie weiterhin auch für die Synthese von **239** aus der entsprechenden Sialinsäure Neu5AcNH₂ (**185**) durch aufeinanderfolgende Einwirkung von CSS und $\alpha 2,3$ -SiaT verwendet (Abb. 71).

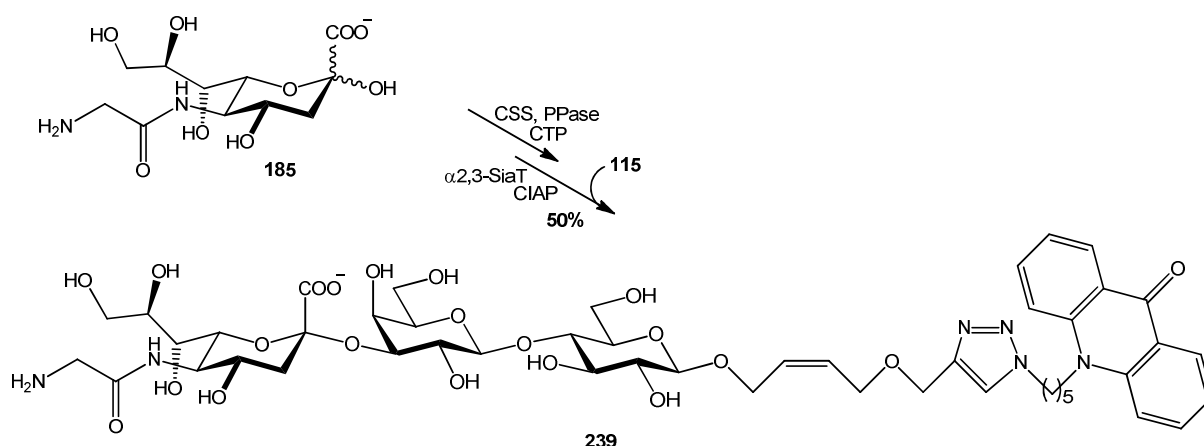


Abb. 71: Synthese des $\alpha 2,3$ -Sialooligosaccharids **239** mittels Kaskaden-Strategie.

Die Arbeiten von Yu *et al.* zeigen, dass die verschiedenen an C5- oder C9-Position modifizierten, CMP-aktvierten Neu5Ac- oder KDN-Derivate als Donor während der $\alpha 2,8$ -Sialyltransfer-Reaktion von der Mutante CstII $\Delta 32^{I53S}$ akzeptiert und auf Neu5Ac-, Neu5Gc(**171**)-, KDN(**169**)- und Neu5Ac $9N_3$ (**162**)-Konjugate übertragen werden konnten.^[146] Jedoch hat diese Mutante eine beschränkte Akzeptorsubstrattoleranz, so dass die mit verschiedenen *N*-Acyl-Gruppen modifizierten Formen (außer Neu5Gc-Konjugate), wie z.B. Sialinsäurekonjugate mit *N*-Azidoacetyl- (**172**), *N*-Methylglycolyl, usw. an der C5-Position der Neu5Ac-Derivatereste, bzw. auch die C5-*O*-Methyl- und C5-Azido-KDN-Analogakonjugate die von der Mutante CstII $\Delta 32^{I53S}$ -katalysierte $\alpha 2,8$ -Sialyltransfer-Reaktion blockieren.^[146]

In eigenen Versuchen wurden die Acridon-markierten $\alpha 2,3$ -Sialylkonjugate **235**, **237** und **238** (Abb. 72), ausgehend von den hergestellten Rohprodukten CMP-Neu5Ac N_3 (**209**) und CMP-Neu5Hex (**210**) als Donorverbindungen, durch die Katalyse der $\alpha 2,3$ -SiaT (CstII $\Delta 32$) unter Verwendung von CIAP in guter Ausbeute erhalten. Die entsprechenden Disialoside konnten in der DC-Kontrolle nur als schwache Punkte beobachtet, aber wegen der geringen Mengen nicht isoliert werden.

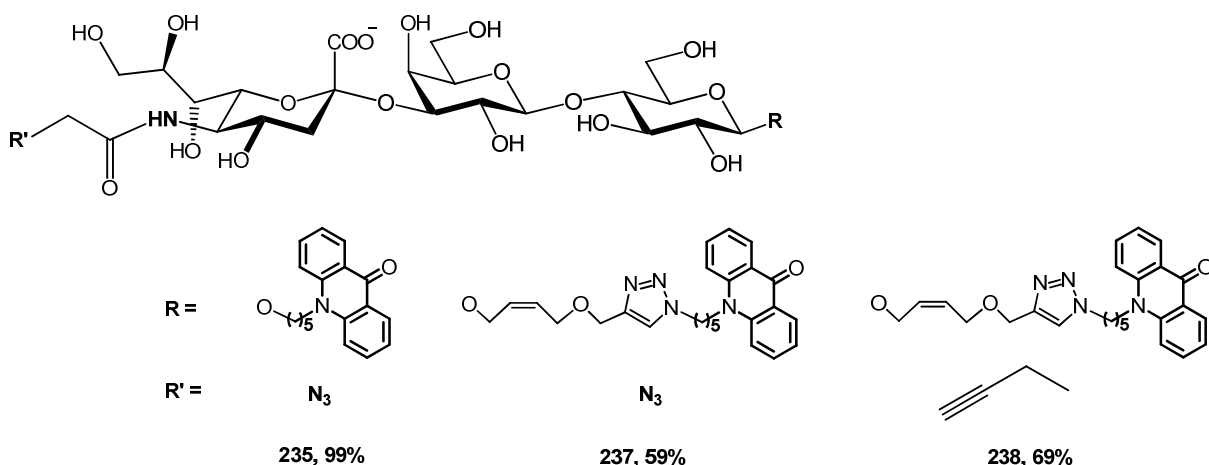


Abb. 72: Synthese der α 2,3-Sialooligosaccharide **235**, **237** und **238** durch Katalyse der α 2,3-SiaT (CstIIA32).

Während der enzymatischen Reaktion muss der pH-Wert ständig kontrolliert und sollte durch gelegentliche Zugabe von NaOH (1 M) im Bereich des pH-Optimums der Enzyme bei 7.5 gehalten werden. Die Aufreinigung aller neu synthetisierten Produkte erfolgte mit Hilfe des hydrophoben Ankers durch Chromatographie über RP-C18-Kieselgel. Es zeigte sich, dass diese Methode alleine nur Edukt/Produkt-Mischungen lieferte, jedoch deren fraktionierende Trennung mit wässrigen Methanolgradienten viel Zeit in Anspruch nahm. Durch Chromatographie über BioGel P2 alleine konnte ebenfalls keine vollständige Aufreinigung gewährleistet werden; so konnte z.B. das in den Reaktionen entstehende Begleitprodukt Cytidin nicht durch Passage über eine BioGel Säule entfernt werden. Als beste Aufreinigungsmethode erwies sich eine Kombination aus sequentieller Chromatographie zuerst über BioGel P2 gefolgt von RP-C18-Kieselgel-Trennung. Mit dieser Vorgehensweise wurden die Oligosaccharid-Rohprodukte zuerst mittels Größenausschluß-Chromatographie über BioGel P2 weitestgehend von niedermolekularen Komponenten aufgereinigt, anschließend auf eine kurze RP-C18-Kieselgel-Säule aufgetragen, mit H₂O gewaschen und dann mit 30-50% wässrigem Methanol in reiner Form eluiert.

Interessanterweise ist die chromatographische Trennung der Monosialyloligosaccharide (**230/232**) von den Disialyloligosacchariden (**231/233**) nach deren präparativer Synthese über RP-C18-Kieselgel erfolgreich. Wegen mehrerer ionisch-polarer Einheiten haben die Disialyl-Produkte (**231/233**) hydrophilere Eigenschaften als die Monosialyl-Produkte (**230/232**). Trotzdem konnten die Produkte (**231/233**) wegen der hydrophoben Eigenschaften des Acridon-Linkers durch physikalische Wechselwirkungen an RP-C18-

Kieselgel gebunden werden. Jedoch konnten die Disialyl-Produkte nach dem Waschen der Rohproduktmischung (enthält Monosialyl- und Disialyl-Konjugate) mit H₂O bei Elution mit einem Gradienten von 5-20% wässrigem Methanol zuerst in reiner Form vom Träger abgelöst, und damit von den Monosialyl-Konjugaten gut abgetrennt werden. Die Monosialyl-Konjugate (**230/232**) wurden anschließend mit 30-50% wässrigem Methanol rein eluiert.

Synthese von doppelt fluoreszenzmarkierten Sialylkonjugaten

Die Verfügbarkeit fluoreszenzmarkierter Sialyldonoren und Sialylakzeptoren machte erstmals Experimente zur enzymatischen Herstellung doppelt terminal markierter Oligosaccharide möglich, wobei sogar verschiedene Fluorophor-Kombinationen erreichbar waren. Wegen der zu ähnlichen Emissionsmaxima von Cumarin- und Acridonmarkern wurden derartige Kombinationen allerdings zurückgestellt.

Doppelt fluoreszenzmarkierte Sialylkonjugate können vermutlich enzymatisch durch Sialyltransferase-Übertragung von CMP-aktivierten fluoreszenzmarkierten Sialinsäuren auf einen fluoreszenzmarkierten Akzeptor oder chemisch aus fluoreszenzmarkierten Sialinsäurekonjugaten mit einem zweiten Fluorophor als relativ sicheres Syntheseverfahren gebildet werden. Für die chemische Synthese des mit Rhodamin/Acridonfluorophoren doppelt fluoreszenzmarkierten Sialylkonjugats **236** wurden Azido-funktionalisierte Sialinsäurekonjugate Neu5AcN₃- α 2,3-Lac-P-Acr (**235**) und Alkin-gekoppeltes Chromophor Rhodamin-Pentin (**6**) benötigt, aus denen das gewünschte Produkt **236** durch Click-Reaktion in einer Ausbeute von 69% (Abb. 73) erhalten wurde. Das Produkt **236** leuchtet intensiv rotviolett (Abb. 73), was einerseits auf eine unabhängige Mischung aus dem Blau des Acridons und dem Rot des Rhodamins zurückgeführt werden könnte, aber insbesondere im Hinblick auf die visuell scheinbare erhöhte Intensität auch auf intramolekularen Energietransfer (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer, FRET) hinweisen könnte. Detaillierte photophysikalische Untersuchungen, die auch Hinweise auf die Vorzugskonformation des Saccharids in Lösung liefern könnten, wurden jedoch zunächst zurückgestellt. Auf einem alternativen Syntheseweg konnte das Produkt **236** auch aus CMP-Sia-L_k-Roh (**219**) als Donorsubstrat mit Lac-P-Acr (**105**) als Akzeptor durch die α 2,3-SiaT enzymatisch synthetisiert werden (Abb. 73), jedoch ist diese Route wegen der problematischen Zugänglichkeit und Labilität von **219** ungünstig und wurde daher nur analytisch, nicht aber präparativ getestet.

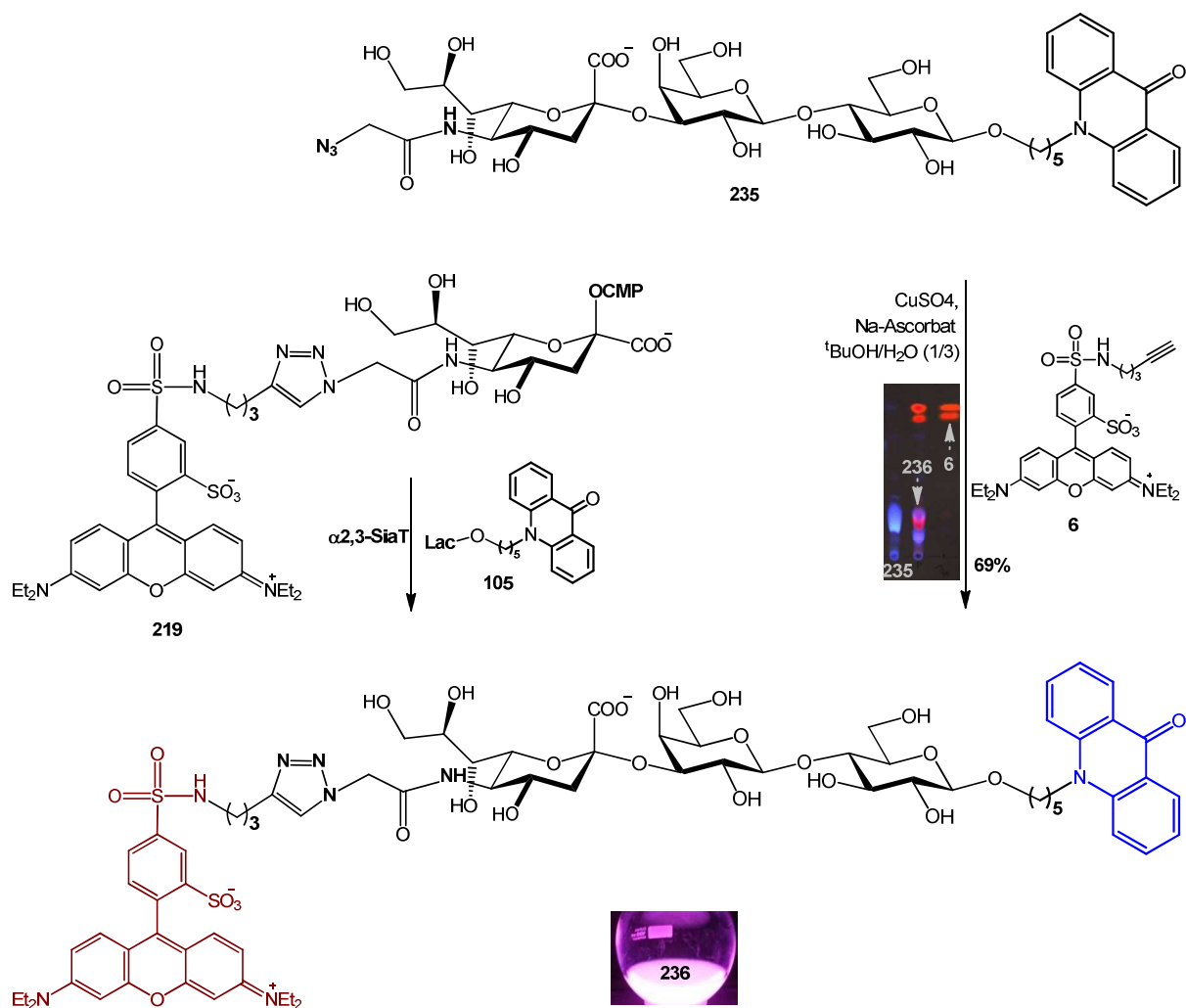


Abb. 73: Synthese des mit Rhodamin und Acridon gekoppelten Oligosaccharids **236**.

Das mit FITC und Acridon gekoppelte Oligosaccharid **240** (Abb. 74) wurde ebenfalls durch eine kombinierte chemo-enzymatische Reaktion-Sequenz aus Neu5AcNH₂ (**185**) hergestellt. Die Glycin-Sialinsäure **185** wurde nach quantitativer enzymatischer Aktivierung in situ durch die CSS anschließend auf das Lac-D-T-P-Acr (**115**) als Akzeptorverbindung durch α 2,3-SiaT-Katalyse übertragen. Nachdem die DC-Kontrolle eine vollständige Umsetzung von **115** zum Zwischenprodukt Neu5AcNH₂- α 2,3-Lac-D-T-P-Acr (**239**) anzeigte, wurde der enzymatischen Reaktionsmischung FITC zugesetzt. Dieses reagierte mit dem freien Aminrest im Zwischenprodukt **239** bei pH 9.0 zum gewünschten Thioharnstoffaddukt **240**, das nach der Aufreinigung durch Chromatographie über BioGel P2 mit einer Gesamtausbeute von 47% erhalten werden konnte. Die alternative Übertragung der FITC-gekoppelten CMP-Sialinsäure (CMP-Sia-FITC) auf das Akzeptor-Lactosid **115** wurde für die Synthese von **240** nicht getestet,

da **CMP-Sia-FITC**, ähnlich wie **CMP-Sia-L_k-Roh 219**, nicht präparativ durch die enzymatische Aktivierung der entsprechenden Sialinsäure erreichbar war.

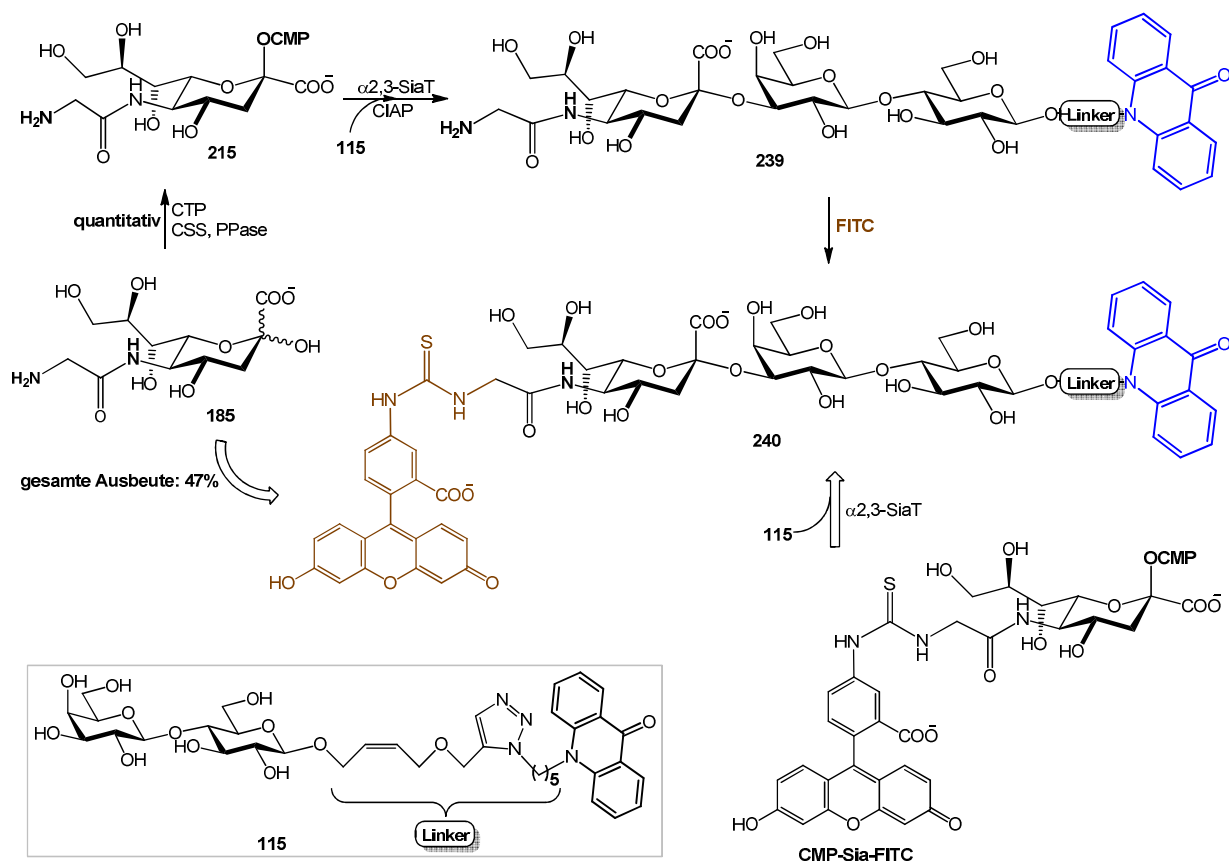


Abb. 74: Synthese des mit FITC und Acridon gekoppelten Oligosaccharids **240**.

Synthese neuartiger $\alpha 2,6$ -Sialyloligosaccharide im Ein-Topf-zwei-Enzym-System

Die $\alpha 2,6$ -Sialyltransferase aus *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145 katalysiert die Übertragung von CMP-aktivierten Sialinsäuren α -selektiv auf die C6-Position terminaler Galactose- oder GalNAc-Einheiten von Akzeptor-Zuckern und besitzt eine hohe Homologie zu der marinen bakteriellen Sialyltransferase, $\alpha 2,6\text{-SiaT}$ aus *Photobacterium damsela* JT0160.^[308] Letztere zeigt eine breite Substrattoleranz und wurde schon häufig in präparativen enzymatischen Synthesen von Sialooligosacchariden,^[82] Sialyl-T_N-Glycopeptiden mit Neu5Ac, Neu5Gc oder acetylierten Sialinsäuren^[309, 310] sowie Sialylpolysacchariden^[311] verwendet. Bisher wurde jedoch noch keine präparative Verwendung der $\alpha 2,6$ -Sialyltransferase aus

Photobacterium leiognathi JT-SHIZ-145 für die Synthese von Sialokonjugaten publiziert. Im Vergleich zu allen Säugetier- und den meisten Bakterien-Sialyltransferasen, die ihre maximale Aktivität bei saurem bis neutralem pH-Wert haben, zeigt diese α 2,6-Sialyltransferase eine maximale Aktivität bei alkalischem pH 8,^[138] was für die Synthese von Sialokonjugaten eine bedeutende Rolle spielt. Einerseits sind nämlich CMP-Sialinsäure als Edukte sowie die Sialokonjugate als Produkte typischer Weise in basischer Reaktionsumgebung stabiler. Auch andererseits die CSS-Aktivierungsreaktion verläuft optimal unter basischen Bedingungen. Daher ist eine Sialyltransferase mit einem alkalischen pH-Optimum für die Synthese von modifizierten Sialylkonjugaten oder Glycoproteinen aus den entsprechenden pH-empfindlichen CMP-Sialinsäuren als Kaskadenreaktion nach der Eintopf-Synthesestrategie mittels den Enzymen CSS und SiaT besonders wertvoll.

Im Zuge der eigenen Studien mit dieser α 2,6-SiaT wurden verschiedene neuartige Sialokonjugate **241-250** als Eintopf-Reaktion erfolgreich und in guten Ausbeuten hergestellt. Die verschiedenen Sialinsäuren, einschließlich der 9-Azido-Neu5Ac **162**, der verkürzten Neu5Ac-Derivate **163** und **168**, des Sulfonamids Neu5Ms (**176**), der N-Acyl-Varianten **171-173**, **175** bzw. der desaminierten Neu5Ac **169** und **170**, wurden in situ durch die CSS zu den entsprechenden CMP-Sialinsäuren **203-212** in Gegenwart von anorganischer Pyrophosphatase quantitativ umgesetzt. Anschließend wurden diese Zwischenprodukte durch die α 2,6-SiaT auf den Akzeptor Lac-D-T-P-Acr (**115**) unter vollständigem Verbrauch des Akzeptors mit Hilfe von alkalischer Phosphatase übertragen (Abb. 75). Die präparativ synthetisierten α 2,6-Sialooligasaccharide **241-250** wurden durch kombinierte Säulenchromatographie zunächst über BioGel P2, dann RP-C18-Kieselgel in hoch reiner Form isoliert. Eine eindeutige Charakterisierung erfolgte durch ESI-MS, ¹H-, ¹³C-, COSY- und HSQC-NMR-spektroskopische Analyse. Nur das Produkt **250** konnte wegen Substanzmangel nur in kleinerem Maßstab (ca. 5 mg) synthetisiert werden, so dass die Produktidentität bisher nur durch ESI-MS, nicht jedoch über NMR-Daten gesichert werden konnte. Die Ergebnisse aller neuen Synthesen sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

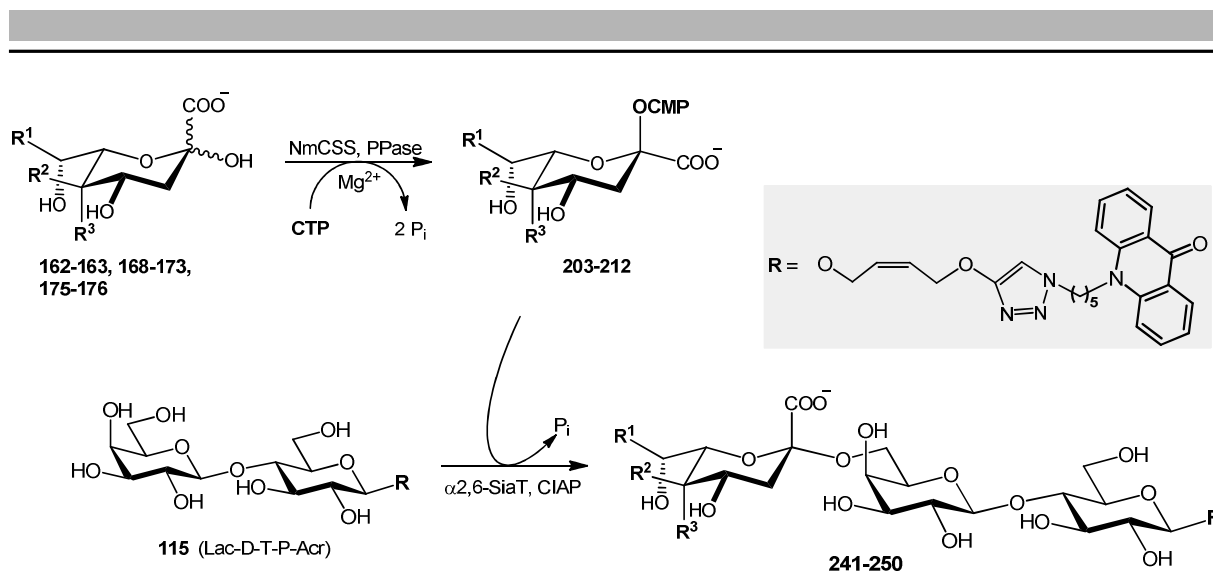


Abb. 75: Synthese neuartiger α 2,6-Sialylkonjugate im Eintopf-Verfahren.

Tabelle 12: Neu hergestellte fluoreszenzmarkierte α 2,6-Sialylkonjugate

Sialylkonjugate		R ¹	R ²	R ³	Ausbeute
Neu5Ac9N ₃ - α 2,6-Lac-D-T-P-Acr	241	CH ₂ N ₃ CHOH	NHAc	H	83%
C8-Neu5Ac- α 2,6-Lac-D-T-P-Acr	242	CH ₂ OH	NHAc	H	74%
C7-Neu5Ac- α 2,6-Lac-D-T-P-Acr	243	H	NHAc	H	76%
KDN- α 2,6-Lac-D-T-P-Acr	244	CH ₂ OHCHOH	OH	H	76%
Epi-KDN- α 2,6-Lac-D-T-P-Acr	245	CH ₂ OHCHOH	H	OH	82%
Neu5Gc- α 2,6-Lac-D-T-P-Acr	246	CH ₂ OHCHOH	NHCOCH ₂ OH	H	81%
Neu5AcN ₃ - α 2,6-Lac-D-T-P-Acr	247	CH ₂ OHCHOH	NHCOCH ₂ N ₃	H	78%
Neu5Hex- α 2,6-Lac-D-T-P-Acr	248	CH ₂ OHCHOH	NHCO(CH ₂) ₃ C \equiv CH	H	87%
Neu5Bz- α 2,6-Lac-D-T-P-Acr	249	CH ₂ OHCHOH	NHCOPh	H	98%
Neu5Ms- α 2,6-Lac-D-T-P-Acr	250	CH ₂ OHCHOH	NHSO ₂ CH ₃	H	90%

3.3.5. Versuche zur Übertragung fluoreszenzmarkierter Sialinsäuren auf Erythrozyten

Auf der Zellmembran befinden sich Sialinsäurekonjugate in hoher Dichte, z.B. mehr als 10 Millionen Sialinsäuren pro menschlichem Erythrozyt. Diese Sialinsäuren spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Molekülen und Membranen bzw. bei der Modulierung der Wechselwirkung mit der Umgebung.^[23] Die Modifizierung des Glykans der Zelloberfläche durch fluoreszenzmarkierte Sialinsäure könnte dabei helfen, physiologische und pathologische Prozesse besser zu verstehen, wie z.B. die Funktion der Zelloberflächenglykane während der Zell-Maturation oder die Aktivierung und Glycosylierung auf der Zelloberfläche in lebenden Zellen.^[239]

Die Bildung fluoreszenzmarkierter Blutzellen mittels Sialyltransfer wurde bereits früher von *Bollheimer et al.* untersucht. Als fluoreszierende Sialyl-Donorsubstrate für die Resialylierung von Sialidase-vorbehandelten Erythrozyten durch α 2,3- oder/und α 2,6-SiaT wurden 9- und 5-Fluoresceinyl-markierte CMP-Sialinsäuren verwendet.^[239]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Cumarin-markierte CMP-Sialinsäure (**218**) für den Versuch zur enzymatischen Fluoreszenzmarkierung von roten Blutkörperchen verwendet. Um dieses Ziel zu erreichen, mussten zuerst menschliche rote Blutzellen durch Sialidase nach bekannter Vorschrift desialyliert werden,^[312] damit die sialinsäurefreie Erythrozyten-Oberfläche an den Sialyl-Akzeptor-Resten für einen modifizierten Sialyltransfer vorbereitet ist. Sialidase (Neuraminidase; EC 3.2.1.18) katalysiert die Abspaltung von Sialinsäuren aus verschiedenen Sialinsäure-enthaltenden Glycokonjugaten in Lösung oder auf Zellmembranen. Enzyme mit dieser Aktivität wurden in Viren, Parasiten, Bakterien und höheren Organismen beschrieben.^[313-316] Bei der Pathogenese mancher Krankheiten, wie z.B. der Chagas-Krankheit, ist eine Sialidase beteiligt, die durch *Trypanosoma*-Parasiten produziert wird.^[317] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die kommerziell erhältliche Sialidase aus *Clostridium perfringens*^[318] für die Desialylierung von Erythrozyten verwendet. Die Detektion der freigesetzten Sialinsäuremenge nach der Sialidase-Behandlung erfolgte anhand des konventionellen TBA-Assays.^[319] Nach der Desialylierung wurden die Erythrozyten von restlicher Sialidase durch mehrfaches Waschen mit Saline (0.9% Kochsalzlösung) befreit und mit der synthetischen fluoreszenzmarkierten CMP-Sialinsäure **218** in Gegenwart der α 2,3-SiaT (CstII Δ 32) bei 37°C inkubiert. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Anregung bei 450 nm zeigte, dass die maximale Fluoreszenzentwicklung auf den Erythrozyten nach 9-stündiger Reaktionsdauer erhalten wurden (Abb. 76). Trotz vielfacher Variation der

Reaktionsbedingungen (Temperatur, Dauer, Waschzyklen, Enzymmenge usw.) blieb das Ergebnis allerdings hinter der Erwartung zurück. Zwar war die erreichte Fluoreszenzmarkierung eindeutig, dosisabhängig und führte zu einer weitgehend uniformen Färbung der beobachteten Erythrozytenpopulation, jedoch war die erreichbare Fluoreszenzintensität relativ schwach ausgeprägt, was die Dokumentation wegen des vergleichsweise schwachen Kontrasts erschwerte. Vermutlich war die Effizienz des Sialyltransfers eingeschränkt durch die begrenzte Konzentration des markierten Sialyldonors **218** (Substanzmangel, Gefahr unspezifischer Hintergrundfärbung) sowie dessen möglicher Instabilität unter den Reaktionsbedingungen. Weitere Gründe wären die reduzierte Effizienz des Sialyltransfers durch den sperrigen Fluoreszenzmarker in **218** oder die eventuell eingeschränkte räumliche Zugänglichkeit der desialylierten terminalen Galactosyleinheiten auf der Erythrozytenmatrix für die Bindung der Sialyltransferase. Möglicherweise wird auch ein Teil der relativ kurzwelligen Fluoreszenz des Cumarin-Chromophors durch Zellbestandteile gequenchet.

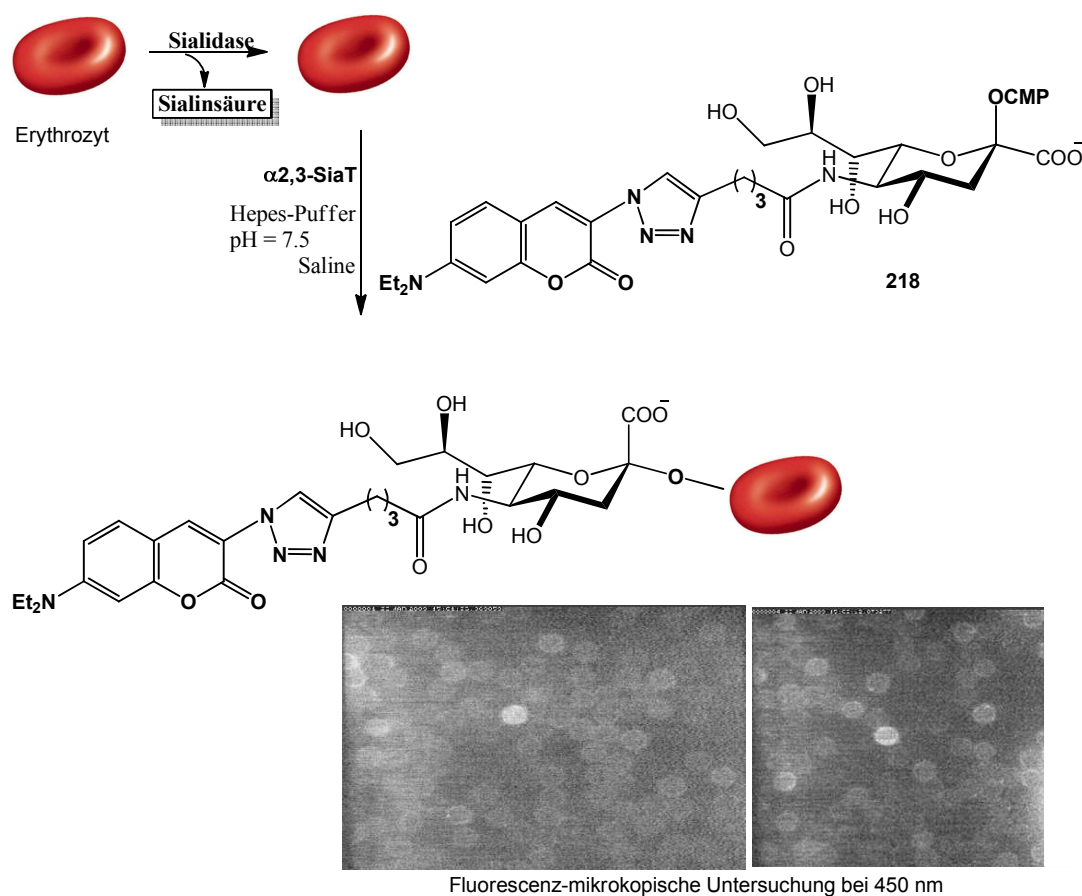


Abb. 76: Fluoreszenz-Markierung von Erythrozyten und Dokumentation durch Fluoreszenzmikroskopie.

Stärker fluoreszierende, stabile Zellen könnten eventuell durch die Verwendung eines intensiver und längerwellig fluoreszierenden Sialyltransferase-Donors bei niedriger Reaktionstemperatur und unter der kombinierten Katalyse durch $\alpha 2,3$ - und $\alpha 2,6$ -SiaT erhalten werden, wodurch die Konzentration an resialylierten Glycokonjugaten auf den Erythrozyten-Oberflächen wegen der verdoppelten Sialyltransfer-Möglichkeit erhöht würde. Rhodamin als alternativer Fluoreszenzmarker fluoresziert wegen seines hohen molaren Absorptionskoeffizienten im sichtbaren Bereich stark und wird in der strukturellen Mikroskopieforschung als Photosensibilisator bzw. als Laserfarbstoff verwendet.^[245, 320, 321] Deswegen wäre hierfür vermutlich die synthetisierte Rhodamin-markierte CMP-Sialinsäure **220** (Abb. 77) als alternatives Sialyltransferase-Donorsubstrat vielversprechender. Hinsichtlich der begrenzt verfügbaren Substanzmengen an reinen, CMP-aktivierten Sialyldonoren sowie der zum Zeitpunkt der Studien noch nicht verfügbaren 2,6SiaT wurden weiterführende Studien hierzu zunächst zurückgestellt.

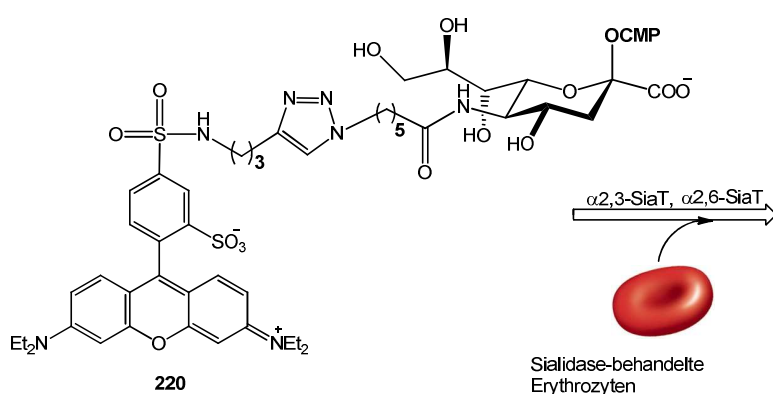


Abb. 77: Bildung fluoreszierender Blutzellen mit alternativem Sialyltransferase-Donorsubstrat **220**.

Eine konzeptionell abweichende Strategie könnte auch über die Azid-modifizierten Sialinsäuren Erfolg haben. Hierfür wäre insbesondere die stabilere, mit doppelter Azidsubstitution modifizierte CMP-Sialinsäure **179b**, die durch die Aktivierung der hergestellten Sialinsäure **179** gebildet wird, als Sialyltransfer-Donor geeignet. Resialylierung von Erythrozytenmembranen mit dem noch kinetisch eng bei der natürlichen Neu5Ac liegenden Analogon **179** sollte effizienter verlaufen. Postsynthetisch könnte dann die anschließende Fluoreszenzmarkierung durch selektive Kupplungsreaktionen an der Sialinsäure **179** auf der Zelloberfläche eventuell durch zwei chemische Konjugationsmethoden erreicht werden. Die Azid-Gruppen könnten entweder mit Cyclooctin-

modifizierten Rhodamin-Derivaten (**260**) mittels einer für die Zellen nicht toxischen, ringspannungsinduzierten, kupferfreien Azid-Alkin-Cycloaddition^[233, 322-324] oder mit Phosphan-verlinkten Rhodamin-Derivaten (**261**) durch Staudinger-Ligation^[325] gekoppelt werden. Damit würden die lebenden Zellen effektiv stark fluoreszenzmarkiert. Der geplante Syntheseweg ist in der Abb. 78 skizziert.

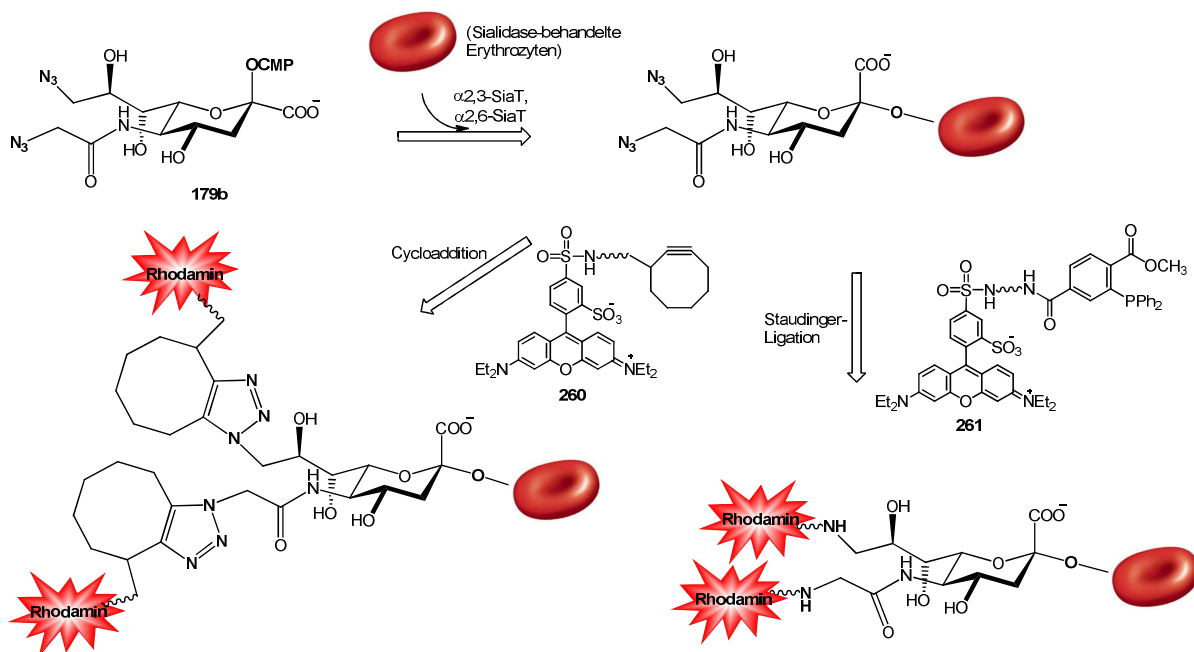


Abb. 78: Plan zur Erzeugung stark fluoreszierender lebender Zellen.

3.4. Synthese von Oligosacchariden mit internen Sialinsäuren

3.4.1. Synthese und Aktivierung von Akzeptor-konjugierten Sialinsäure-Donoren

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass Kapsel- und Zellwand-Polysaccharide von bestimmten pathogenen Organismen, wie z.B. *Salmonella arizonae*, *Neisseria meningitidis* oder *Sinorhizobium freidii*, auch einen internen Sialinsäure-Rest als sich wiederholendes Oligosaccharid-Bauelement enthalten können.^[33, 34, 326, 327] Beispielsweise haben das O-Antigen von *Salmonella arizonae* O21^[33] bzw. *Neisseria meningitidis*^[326] -Gruppen W135 und Y die Neu5Ac-enthaltenden Polysaccharide mit sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten, wie

[\rightarrow 3)- α -L-FucpN(\rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc(\rightarrow 7)- α -D-Neup5Ac(\rightarrow 2) \rightarrow] (a; Abb. 79), [\rightarrow 6)- α -L-Galp(\rightarrow 4)- α -D-Neup5Ac(\rightarrow 2) \rightarrow] (b; Abb. 79) und [\rightarrow 6)- α -L-Glcp(\rightarrow 4)- α -D-Neup5Ac(\rightarrow 2) \rightarrow] (c; Abb. 79). In der Zell-Membran von *Sinorhizobium freiddi* SVQ293^[34] wurde das KDN-enthaltende Polysaccharid mit [\rightarrow 2)- α -D-Galp(\rightarrow 2)- β -D-Ribf(\rightarrow 9)- α -5-O-Me-D-KDNp(\rightarrow 2) \rightarrow] (d; Abb. 79) als Wiederholungseinheit detektiert. Diese Polysaccharide (Abb. 79) könnten möglicherweise eine wichtige Rolle spielen als spezifische therapeutische Targets gegen pathogene Virulenz-Faktoren.^[35] Die Gewinnung derartiger Polysaccharide mit internen Sialinsäureeinheiten erweist sich sowohl im Hinblick auf die Isolierung aus natürlichen Quellen^[44] als auch auf eine mögliche chemische Synthese^[328-330] als problematisch. Die Gründe hierfür liegen im Folgenden darin: (1) der Instabilität der tertiären Sialylglycosidbindung; (2) der begrenzten Menge und der Inhomogenität des biologischen Materials, welches schwierig zu reinigen und zu trennen ist, und (3) ihre chemische Synthese ist im Hinblick auf die ökonomischen Aspekte ineffizient.

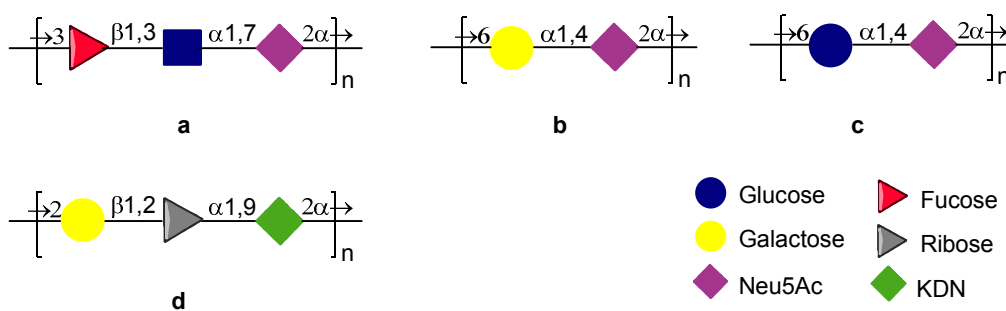


Abb. 79: Die Strukturen von Kapsel- oder Zellwand-Polysacchariden mit internen Sialinsäure-Einheiten.

Um eine effiziente enzymatische Synthesestrategie realisieren zu können, ist nicht nur eine flexible Donor- und Akzeptor-Spezifität der Glycosyltransferase (hier SiaT), sondern insbesondere auch eine hohe Substrattoleranz der CSS für terminal Gal/Lac-verlinkte Sialinsäuren erforderlich, um eine effektive CMP-Aktivierung zu erreichen. Um Sialopolysaccharide aus Donor-Akzeptor-Eigenschaften aufweisende Sialinsäuren rein enzymatisch herstellen zu können, war es sehr wichtig, konstruktiv geeignete Sialinsäuren mit über ein geeignetes Linkerkonstrukt verknüpften terminalen Galactose- oder Lactose-Einheiten zu finden. Das Prinzip dieser Synthesestrategie wird mittels Abb. 80 dargestellt.

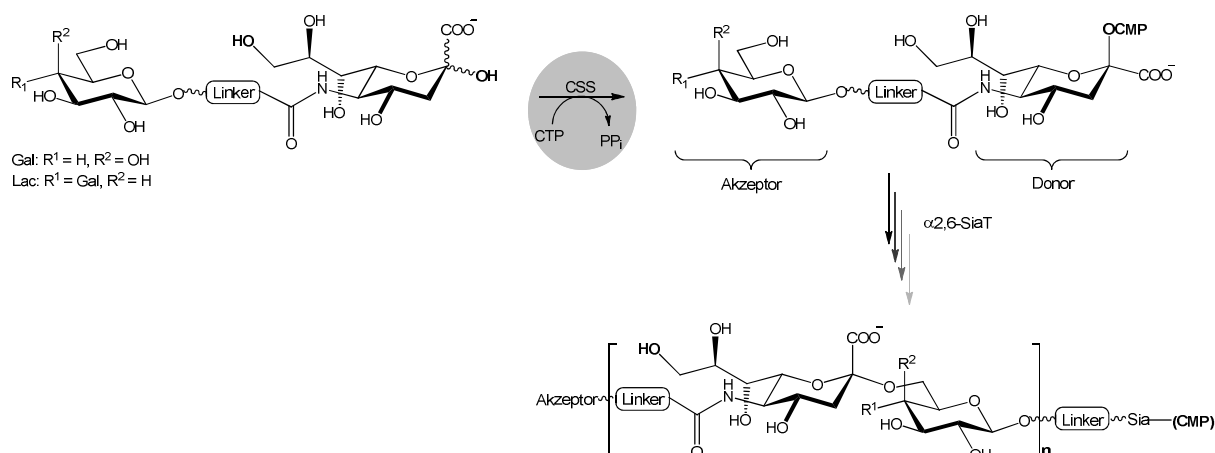


Abb. 80: Synthesestrategie strukturell definierter Sialooligosacchariden.

Aus den bisherigen Ergebnissen bei der Aktivierung verschiedener fluoreszenzmarkierter Sialinsäuren ist abzuleiten, dass selbst mit sehr großen Resten (z.B. Chromophoren) verknüpft Sialinsäuren (**199**, **200**) durch die CSS dann noch aktiviert werden können, wenn die Linker zwischen dem sperrigen Rest und der Sialinsäure lang genug sind. Dadurch kam die Idee auf, dass eventuell auch vom Raumbedarf her ähnliche Gal/Lac-verknüpfte Sialinsäuren noch durch die CSS aktiviert werden könnten.

Strukturell nach dem Muster von **199** konnten die Glycosid-verlinkten Sialinsäuren **188-195** ausgehend von Neu5Hex (**173**) bzw. Neu5HexN₃ (**178**) durch Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) in guter Ausbeute hergestellt werden (Abb. 81). Die Produkte wurden nach Chromatographie über BioGel P2 jeweils als weiße Feststoffe erhalten. Bei den ungeschützten Galactosiden (**58** und **73**) und Lactosiden (**61** und **74**) wurde tBuOH/H₂O (1/3) vorteilhaft als Lösungsmittel in den Click-Reaktionen verwendet. Wegen der geringeren Polarität der acetylierten Glycosiden (**57**, **60**, **71** und **72**) musste Aceton/H₂O (1/3) verwendet werden, damit die Click-Reaktionen in einer homogenen Umgebung mit hoher Reaktivität durchgeführt werden konnten.

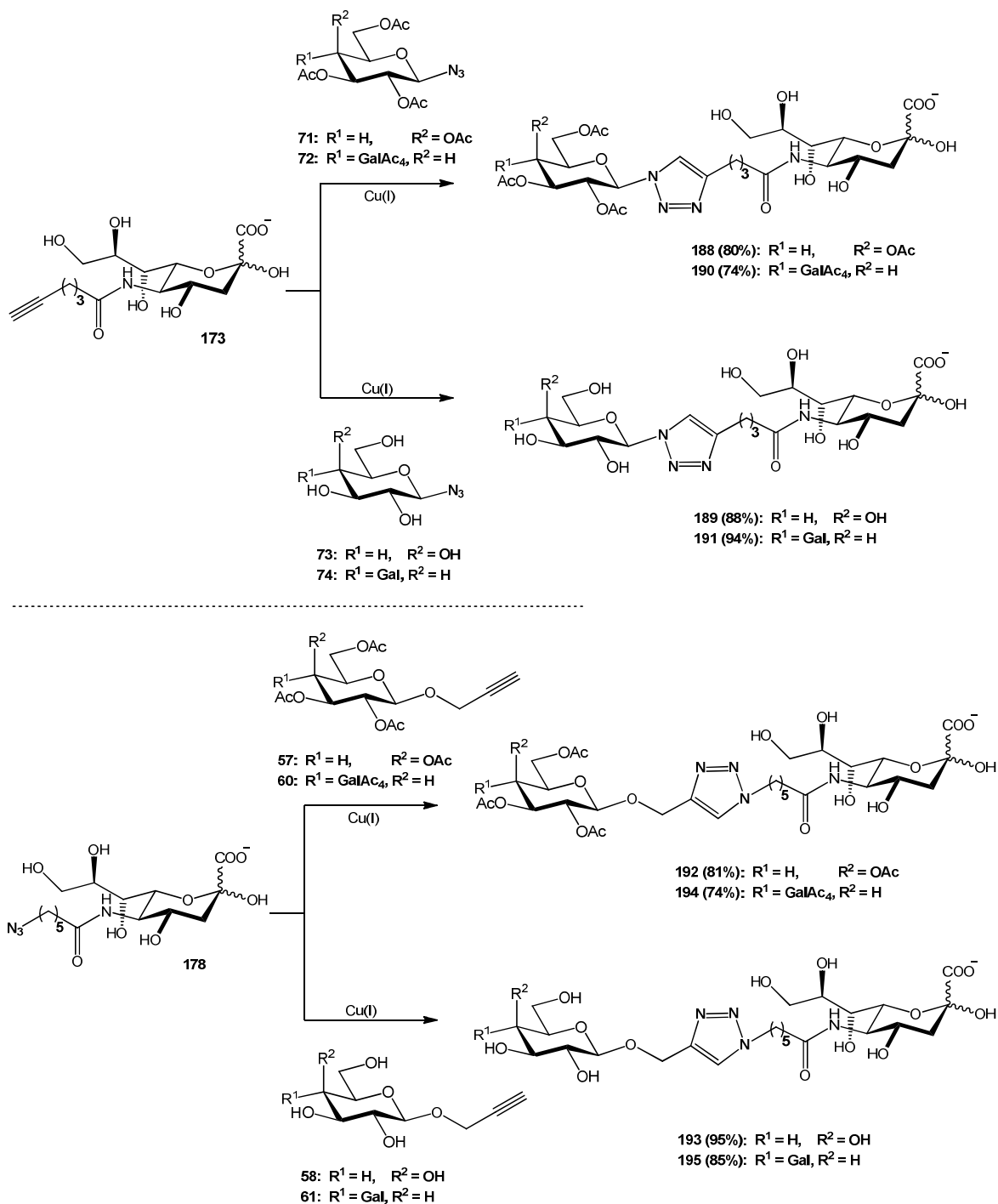


Abb. 81: Synthese der Glycosid-verlinkten Sialinsäuren **188-195** durch CuAAC.

Die Produkte **189**, **191**, **193** und **195** sind besonders interessant für eine strukturell definierte Sialyltransfer-Polymerisation, falls sie durch die CSS direkt zu den korrespondierenden CMP-Sialinsäuren als Sialyldonor-Substrat aktiviert werden könnten. Aus den Verbindungen **188**, **190**, **192** und **194** könnten dagegen die entsprechenden Oligosaccharide mit interner Sialinsäure-Einheit von definierter Länge und definierter Kohlenhydratsequenz mittels der

Abfolge von enzymatischer Aktivierung, Sialyltransfer, Entschützung und eventuell wiederholtem Zyklus für den schrittweisen Sialyltransfer synthetisiert werden (Abb. 82). Diese Technik ist im Vergleich zur publizierten Strategie für Synthesen von Größen-definierten Sialooligosacchariden^[311] mit sich wiederholenden Gal-Linker-Sia-Einheiten einfacher und effizienter, weil die benötigten Monomere (Sialylakzeptor-verlinkte CMP-Sialinsäure) für die Sialyltransferase-katalysierte Pseudo-Polymerisation in unserer Arbeit durch die CSS enzymatisch synthetisiert werden können, jedoch in der unabhängig publizierten Strategie z.B. aus CMP-Neu5AcN₃ (**209**) und peracetyliertem Propargyl-β-Galactosid (**58**) nur chemisch mittels CuAAC hergestellt wurden. Ein großer Vorteil der eigenen Strategie liegt darin, dass die Glycosid-gekoppelte CMP-Sialinsäure als Schlüsselzwischenprodukt direkt ohne weitere chromatographische Aufreinigung in Sialyltransferreaktionen eingesetzt werden kann, und damit diese wertvollen, aber relativ metastabilen (pH-empfindlich) CMP-Produkte ohne Mengenverluste weiter umgesetzt werden können. Außerdem wird erst damit eine Eintopf/zwei-Enzym-Synthesestrategie ermöglicht.

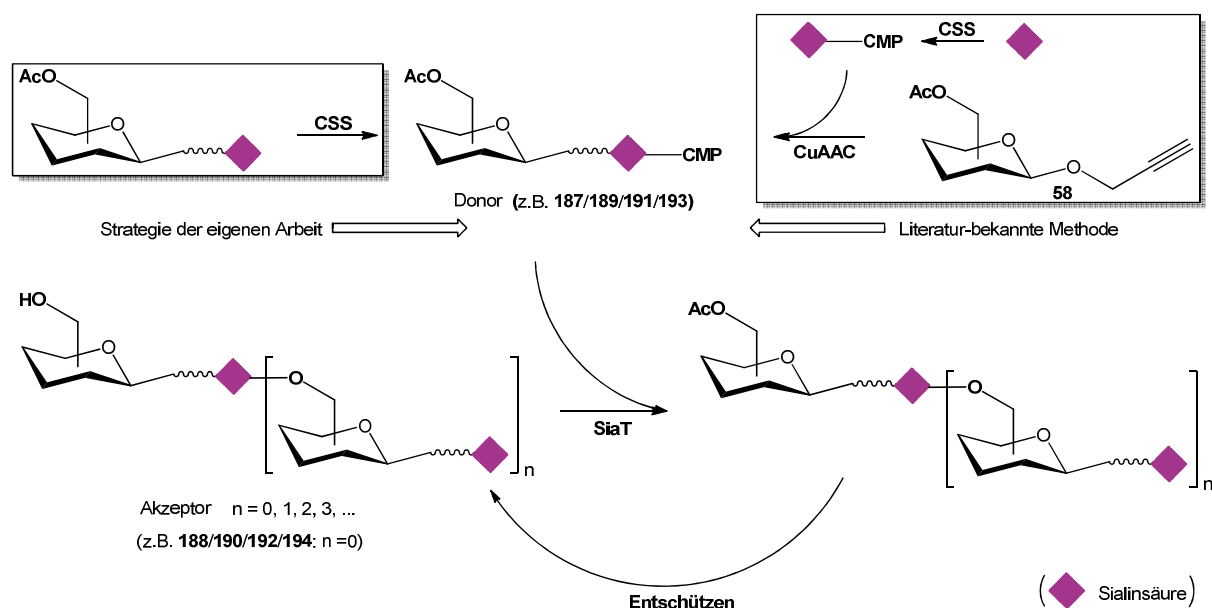


Abb. 82: Syntheseweg zur schrittweisen Herstellung von Sialopolysacchariden mit definierter Größe (Links: eigene Strategie; rechts: publizierte Strategie^[311]).

Enzymatische Aktivierung der Glycosid-verlinkten Sialinsäuren

Für die enzymatische Herstellung von Sialooligosacchariden oder Sialopolymeren durch Sialyltransfer stellt die Aktivierung der mit Galactose oder Lactose verlinkten Sialinsäuren **188-191** oder **192-195** den entscheidenden Schritt dar. Testreaktionen zu Aktivierung wurden zunächst mit 1 Äq. aller Glycosyl-Sialinsäuren **187-194** und 1.2 Äq. CTP in Gegenwart von CSS und anorganischer Phosphatase als Hilfsenzym durchgeführt. Nach 30 min zeigte eine DC-Kontrolle für jede der Reaktionsmischungen positiven Umsatz der Sialinsäuren zu den entsprechenden langsamer laufenden CMP-Konjugaten. Dabei wurden die Substrate **192-195** eindeutig rascher aktiviert als die Substrate **188-191**. Besonders interessant in diesem Vergleich war die Umsetzung der mit peracetylierten Glycosiden gekoppelten Sialinsäuren **192** bzw. **194**, die gegenüber den identisch geschützten Konstrukten **188/190** fast vollständig umgesetzt wurden (Abb. 83). Als mögliche Gründe könnten: 1) die erhöhte Flexibilität durch die zusätzliche CH₂-Gruppe zwischen Glycosid und Triazol im Gal- oder Lac-Teil in **192-195**, 2) die mit 5 Methylengruppen im Amidlinker vergrößerte Distanz des Triazolrings zum Sialinsäureanteil, sowie 3) die regioisomere Orientierung des Triazols im Linker verantwortlich sein, wodurch solche Sialinsäurekonjugate besser in das aktive Zentrum des CSS-Enzyms passen als **188-191**.

Aus den kinetischen Studien zur Substratbindung der CSS wissen wir, dass eine hydrophobe Tasche in der CSS-Struktur zur Bindung von C5-Acylresten der Sialinsäuren vorliegt, deswegen könnten eventuell die mit geschütztem Glycosid verlinkten Sialinsäuren **192** und **194** besser zu den entsprechenden CMP-Sialinsäuren **226** und **228** durch die CSS aktiviert werden als die ungeschützten Konstrukte **193** und **195**. Noch bessere Aktivierungen von **188-195** sind deshalb vermutlich durch die CSS-Mutante F192A zu erwarten, da diese eine größere hydrophobe Tasche besitzt. Eventuell haben die peracetylierten Substrate wegen ihrer hydrophoben Strukturanteile auch unspezifische Bindungsanteile zur Assoziation mit der CSS, was die relative Gesamtgeschwindigkeit im Vergleich zu den polaren ungeschützten Vertretern erhöht. Die CMP-Sialinsäuren **228** und **229** wurden darauf im präparativen Maßstab hergestellt und in situ für die Studien zur Sialopolymersynthese durch α 2,6-SiaT-Katalyse verwendet.

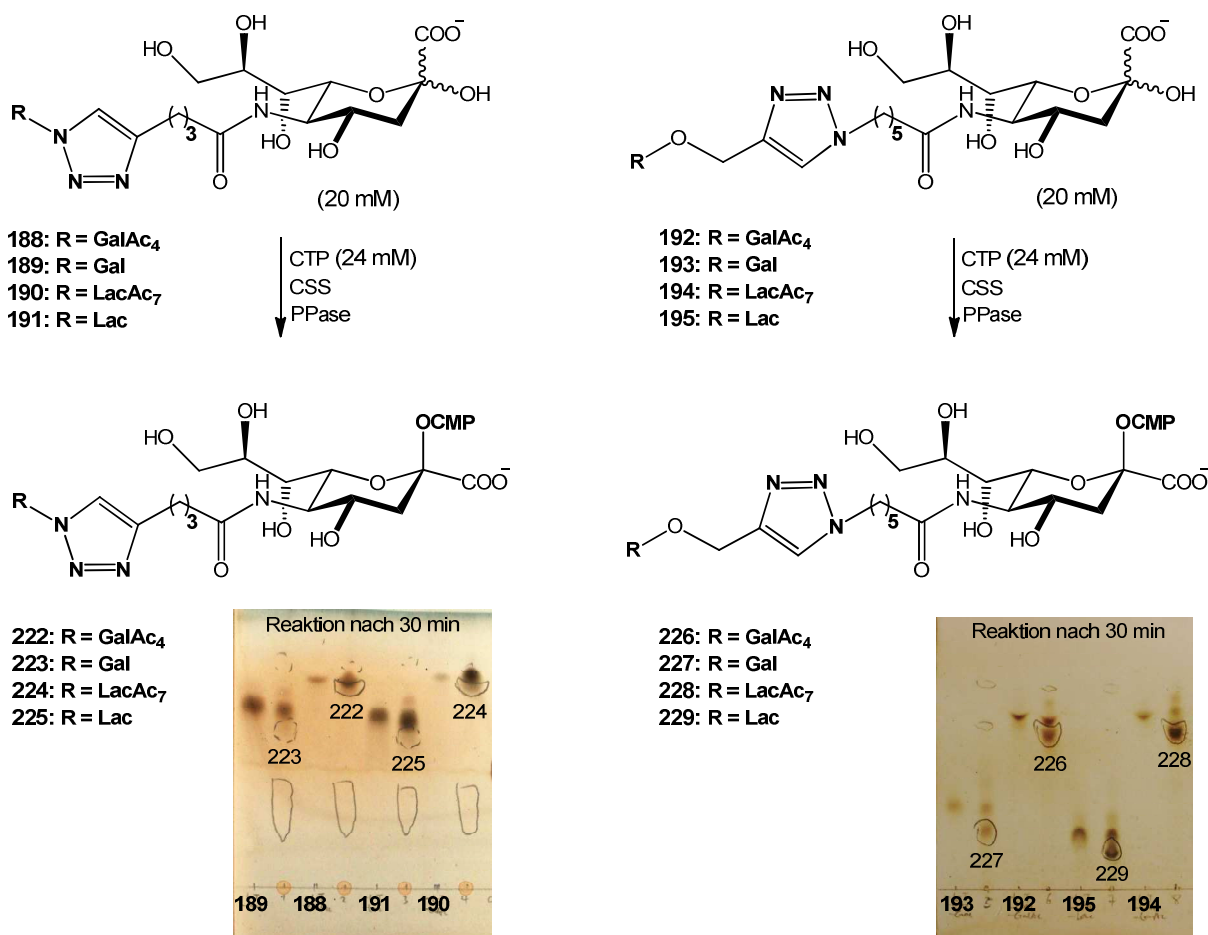


Abb. 83: Studie zur Aktivierung der Glycosid-gekoppelten Sialinsäuren 188-195.

3.4.2. Enzymatische Block-Polymerisation durch gekoppelte Eintopf-Reaktion mittels CSS und α 2,6-SiaT

Den Vorarbeiten zufolge zeigt die von Dong Yi^[331] im Arbeitskreis hergestellte α 2,6-Sialyltransferase aus *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145 eine gute Substrat-Toleranz für Donor- und Akzeptorvariationen. Außerdem besitzt dieses Enzym mit seiner optimalen Aktivität bei mild alkalischem pH-Wert noch einen weiteren attraktiven Vorteil. Deswegen wurde zunächst diese Sialyltransferase für die Synthese neuartiger Sia- α 2,6-Lactose-Einheiten enthaltender Glycopolymere verwendet. Im Erfolgsfall können analoge Arbeiten mit der α 2,3-SiaT nachfolgen.

Zuerst wurden Testreaktionen zum Sialyltransfer der aktivierten Glycosid-verlinkten Sialinsäuren 187-194 auf den fluoreszenzmarkierten Akzeptor (115) durchgeführt. Tatsächlich zeigte sich in der hochempfindlich nachweisbaren Bildung langsamer laufender

fluoreszierender Produktflecken, dass die Glycosid-verlinkten Sialinsäuren **222-229** wegen des schnellen Verbrauchs von **115**, offenbar gute Substrate für die α 2,6-Sialyltransferase sind.

Im folgenden wurden dann, ausgehend von der mit geschütztem Lactosid verlinkten Sialinsäure **194**, die neuartigen, mit einer internen Sialosyllactose-Einheit enthaltenen Sialooligosaccharide **255** und **256** mittels Eintopf-Strategie durch Kombination von CSS und α 2,6-SiaT bei pH = 8.5 präparativ in guten Ausbeuten von 83% bzw. 76% hergestellt (Abb. 84). Nach der Aufreinigung durch Gelpermeationschromatographie an BioGel P2 wurden die beiden Produkte **255** (ein Pseudo-Hexasaccharid) und **256** (ein Pseudo-Pentasaccharid) mittels NMR-spektroskopischer Analyse zweifelsfrei identifiziert.

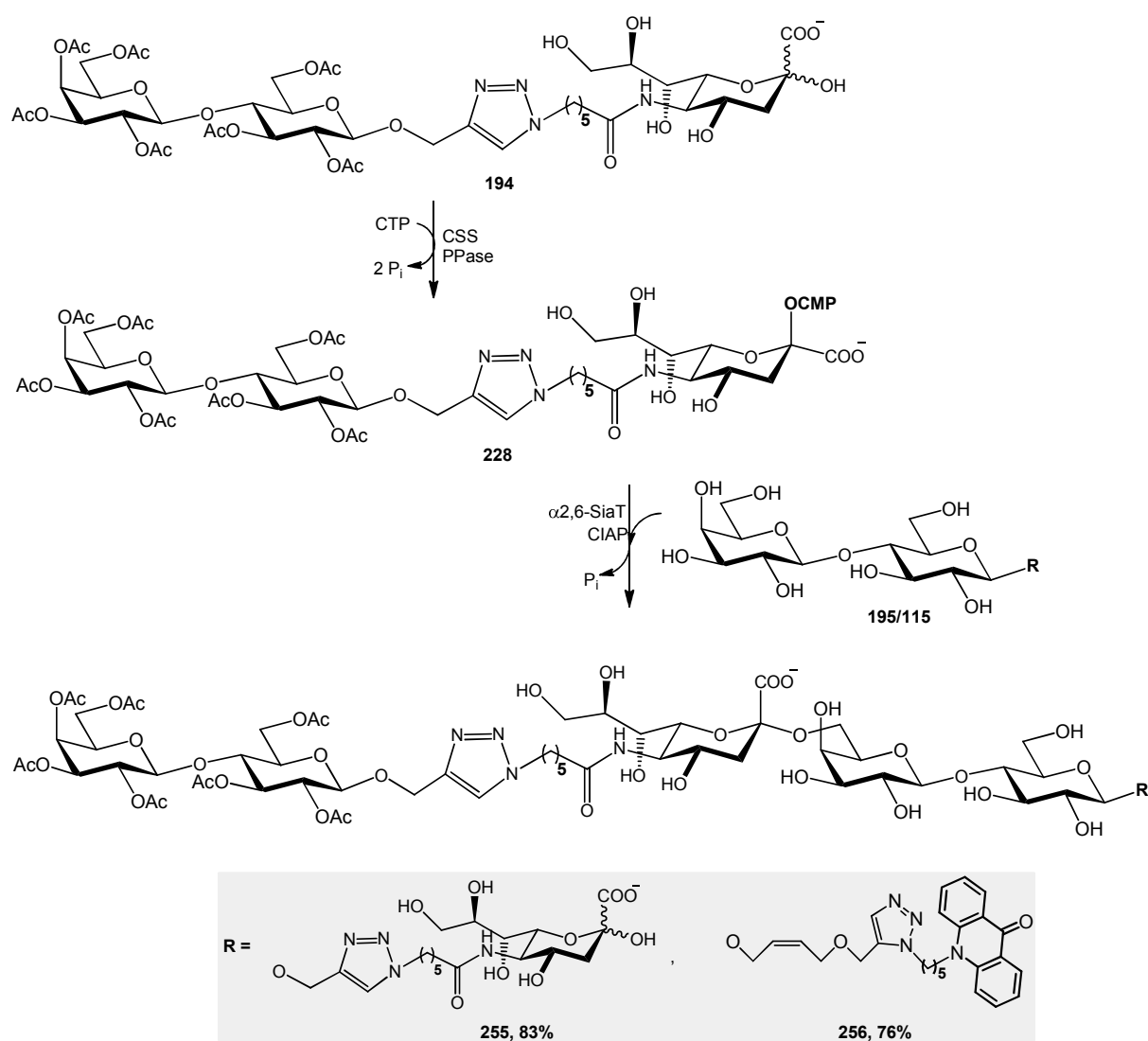


Abb. 84: Synthese der internen Sialyllactose-enhaltenden Sialylkonjugate **255** und **256**.

Die Produkte **255** und **256** ermöglichen prinzipiell die Synthese von größendefinierten Sialopolysacchariden. Beispielsweise könnte **255** nach Entschützen seines terminalen Lactosid-Restes wieder als verlängerter Sialyltransferase-Akzeptor verwendet werden und mit der quantitativ zugänglichen CMP-Sialinsäure **228** als Donorsubstrat durch Sialyltransfer zu höheren Oligosacchariden, wie z.B. den Pseudo-Nonasaccharid (**257**) mit zwei internen Sialyllactose-Einheiten umgesetzt werden. Ausgehend von **257** könnten durch repetitive Nutzung der Reaktionssequenz (Entschützen, Sialyltransfer) die nächst-höheren Struktur- und Größen-definierten Pseudo-Polysaccharide mit drei oder mehreren internen Sialyllactose-Einheiten synthetisiert werden (Abb. 85).

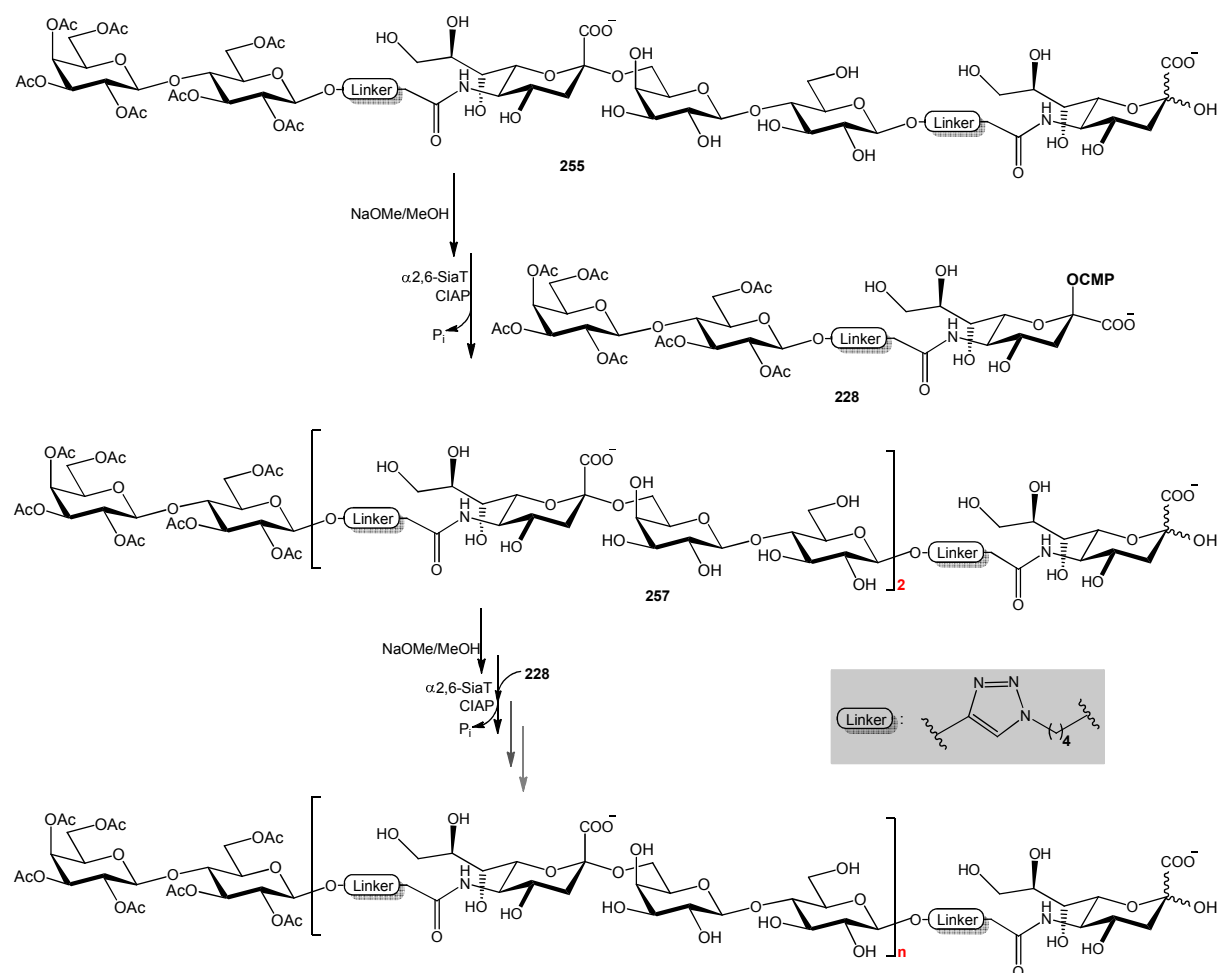


Abb. 85: Geplanter Syntheseweg für Größen-definierte Polysaccharide mit internen Sialyllactose-Einheiten.

Durch Katalyse der α 2,6-SiaT konnte die aktivierte, mit ungeschützter Lactose verlinkte CMP-Sialinsäure **229** ebenfalls auf das Acridon-markierte Lactosid **115** als Sialyltransferase-Akzeptor transferiert werden. Da im Produkt aus dem ersten Sialyltransfer wieder ein freier Lactosylrest in terminaler Position vorhanden ist, kann das Reaktionsprodukt wieder als Akzeptor für einen erneuten Sialyltransfer dienen. Dieser Prozess kann sich periodisch so lange wiederholen, wie ausreichende Restkonzentrationen an Sialyldonor vorhanden sind. Da sowohl **115** als auch die Produkte des ersten und höherer Reaktionsschritte nebeneinander im Reaktionsgemisch vorliegen, ist zu erwarten, dass sich das Produktgemisch ständig zugunsten höherer Oligomerisierungsgrade verändern wird. In der analytischen Reaktionsverfolgung zeigt sich, dass tatsächlich die definierten fluoreszenzmarkierten Pseudooligosaccharide wie z.B. **258a-258d**, strukturell charakterisiert durch die sich wiederholenden internen Sialyllactose-Einheiten, gebildet werden und sich Produkte mit geringerem R_f zunehmend anreichern (Abb. 86).

Im Vergleich zu der mit geschütztem Lactosid **228** ausgeführten Transferreaktion kann das aktivierte **229** nicht nur als Sialyltransferase-Donor für den markierten Akzeptor **115** dienen, sondern potentiell auch selbst als Akzeptor einer Sialyltransfer-Reaktion in Frage kommen, da **229** außer der CMP-Sialinsäure-Einheit noch die terminale Lactose-Einheit besitzt. Das Produkt des Selbsttransfers ist nicht fluoreszierend und wird durch UV-Anregung auf der DC-Probe nicht detektiert. Andererseits ist es selbst wieder als aktivierter Sialyldonor potentiell aktiv und führt dann zur Kettenverlängerung um gleich zwei Trisaccharide-Äquivalente. Dies gewährleistet, dass im Prinzip unabhängig von der Reaktionsfolge ausschließlich fluoreszenzmarkierte Endprodukte vom Typ **258** resultieren, solange eine Hydrolyse des Nucleotidkonjugats ausgeschlossen werden kann.

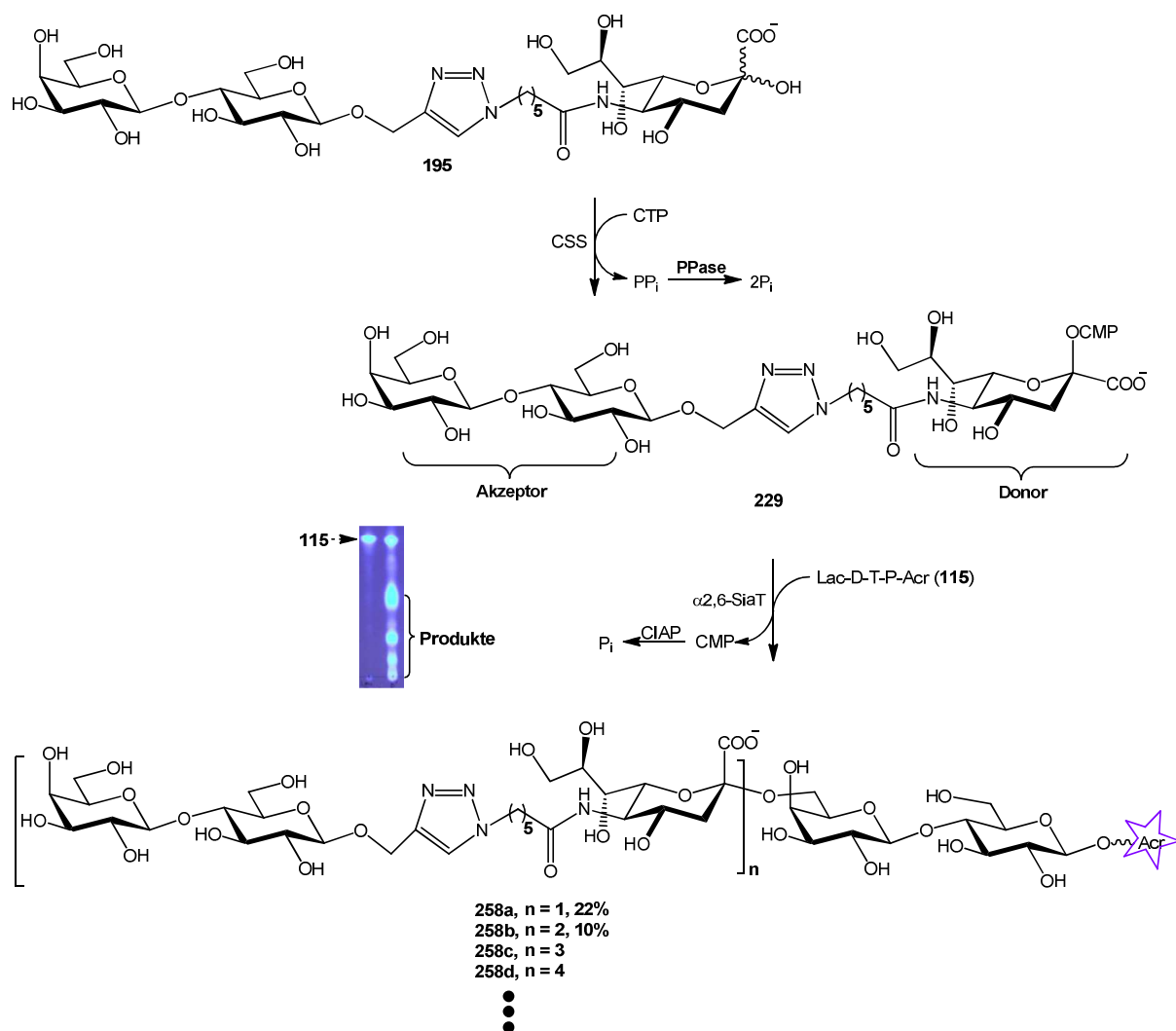


Abb. 86: Synthese neuartiger Sialopolysaccharide durch eine Eintopf/zwei-Enzym-Kaskadenreaktion.

Die präparative Synthese wurde als Eintopf/zwei-Enzym-Reaktionssystem durchgeführt (Abb. 86), jedoch mussten dabei die zwei Teilschritte, CSS-Aktivierung und Sialyltransfer, wieder wegen der Verwendung von alkalischer Phosphatase (Zersetzung des Sialyltransferase-Inhibitors CMP) nacheinander durchgeführt werden.

Die in situ synthetisierte CMP-Sialinsäure **229** wurde wegen ihrer pH-Empfindlichkeit in der Sialyltransfer-Reaktion unter Verwendung der alkalischen Phosphatase sicherheitshalber nur portionsweise eingesetzt. Die portionsweise Zugabe der Donoräquivalente erleichterte auch die Steuerung der Produktbildung zugunsten des weitgehenden Verbrauchs an **115** und Bildung auch höherer Oligomere. Die Acridon-Label in den Polysaccharid-Produkten erleichterten sowohl die Reaktionskontrolle mittels DC unter UV-Anregung, als auch die Aufreinigung der Produkte durch Chromatographie über eine RP-C18-Kieselgelsäule. Um die Produkte durch

Maldi-TOF-MS ohne Störung durch Proteine, Puffer-Salzen bzw. das entstehende Cytidin und Phosphat analysieren zu können, wurden alle wasserlöslichen Verunreinigungen von den Produkten zunächst mittels Chromatographie über RP-C18-Kieselgel mit H₂O als Elutionsmittel abgetrennt. Die Acridon-markierten Saccharide wurden dann mit einem Gradienten von 5-50% MeOH (in H₂O) fraktionierend eluiert und die erhaltenen Produkt-Fractionen wurden dann durch DC (Abb. 87) und Maldi-TOF-MS analysiert. In der Fraktion Nr. 6 wurde das reine fluoreszenzmarkierte Pseudo-Pentasaccharid **258a** durch Maldi-TOF-MS-Analyse detektiert, die Fraktion Nr. 5 enthielt außer **258a** noch Pseudo-Octasaccharid **258b** und in den vereinigten Fraktionen Nr. 1-4 waren neben kleine Mengen von **258a** noch **258b**, Undecasaccharid **258c** und sogar Tetradecasaccharid **258d** im Maldi-TOF-MS-Spektrum nachzuweisen. Als Beispiel wird das Maldi-TOF-MS-Spektrum für die Analyse der Fraktionen 1-4 bzw. 5 in Abb. 88 gezeigt.

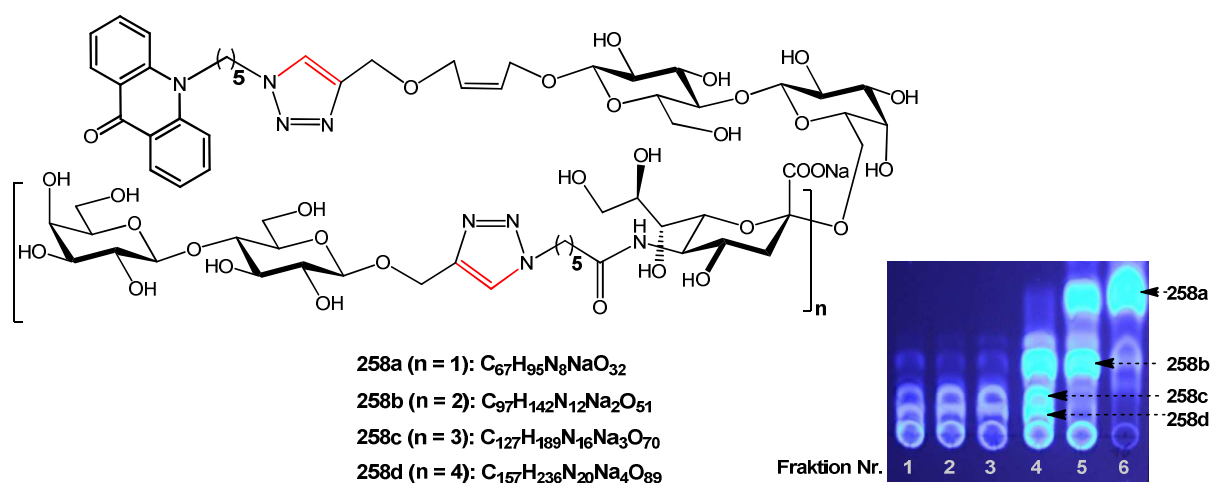
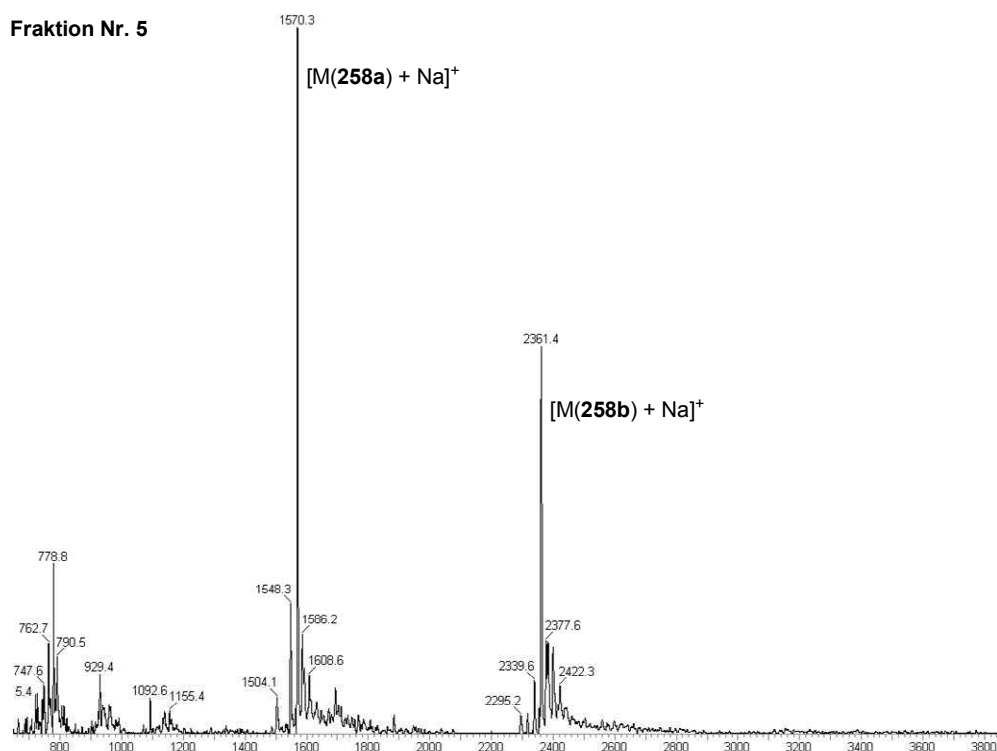


Abb. 87: DC-Analyse der Produktfraktionen (Laufmittel von n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35/35/7/23).

Fraktion Nr. 5



Fraktion Nr. 1-4

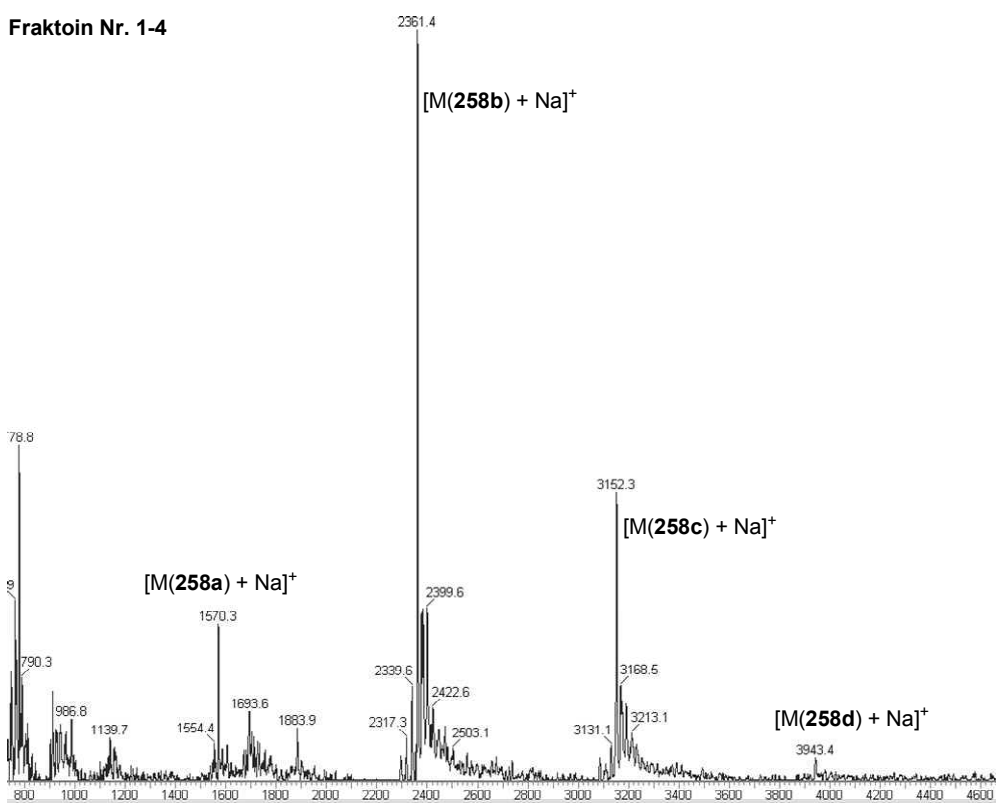


Abb. 88: Maldi-TOF-MS-Spektrum der synthetisierten Pseudo-Polysaccharide.

Um die Regio- und Stereospezifität des Sialyltransfers zu bestimmen, wurden die Reaktionsprodukte aus größer skalierten präparativen Ansätzen isoliert. Dabei gelang es, Proben von hergestelltem Pentasaccharid **258a** bzw. Octasaccharid **258b** mit jeweils einer bzw. zwei Sialyllactose-Einheiten chromatographisch über RP-C18-Kieselgel in Mengen von 10 mg bzw. 8 mg in reiner Form zu isolieren und anschließend durch NMR-Analyse zu charakterisieren. Die ^1H -NMR-Spektren der Produkte **258a** und **258b** bzw. des Edukts **195** sind in Abb. 89 gezeigt. Im Vergleich zum Edukt **195** besitzt **258a** wegen des gekoppelten Triazol-Acridon-enthaltenden Lactosids (**115**) zusätzlich zwei charakteristische Singulets der Triazol-Protonen neben weiteren Aromaten-Signalen. Wenn noch eine weitere Sialinsäure-Einheit **195** auf **258a** durch die α 2,6-SiaT übertragen wird, erhält man das Octasaccharid **258b**, welches dann drei verschiedene Triazol-Protonen aufweist. Jedes Triazol-Proton (Abb. 89; in rot) der Produkte wird mit einer charakteristischen chemischen Verschiebung im Bereich von 7.8-8.0 ppm deutlich separiert. Die Protonen von C2 (3.32-3.19 ppm; Abb. 89; in blau) des Lactose-Restes zeigen die Anzahl der Lactose-Einheit in den Produkten an, z.B. zeigt das blaue Signal (Abb. 89) in **258a** ein doppeltes-Duplett mit zweifachem Integral für zwei C2-Protonen und in **258b** ein Multiplett mit dem dreifachen Integral entsprechend der drei C2-Protonen. Im Vergleich zu **258a** und **258b** zeigt das blaue Signal (Abb. 89) in Edukt **195** ein Triplett nur für ein C2-Proton. Noch charakteristischere Signale zur Definition der Produkte **258a** und **258b** sind die äquatorialen Protonen an C3 des Sialinsäure-Restes (Abb. 89; in gelbgrün). Sie erfahren im α -Glycosid eine chemische Verschiebung von 2.70-2.62 ppm, die sich signifikant von der Verschiebung des Protons im Edukt **195** mit 2.17 ppm unterscheiden, weil sich dort der größere Carboxylatrest in äquatorialer Lage befindet. Mit Hilfe von zwei-dimensionalen NMR-Spektren (COSY, HSQC bzw. HMBC) konnten fast alle Protonen- und Kohlenstoff-Signale der Produkte im Detail zugeordnet werden.

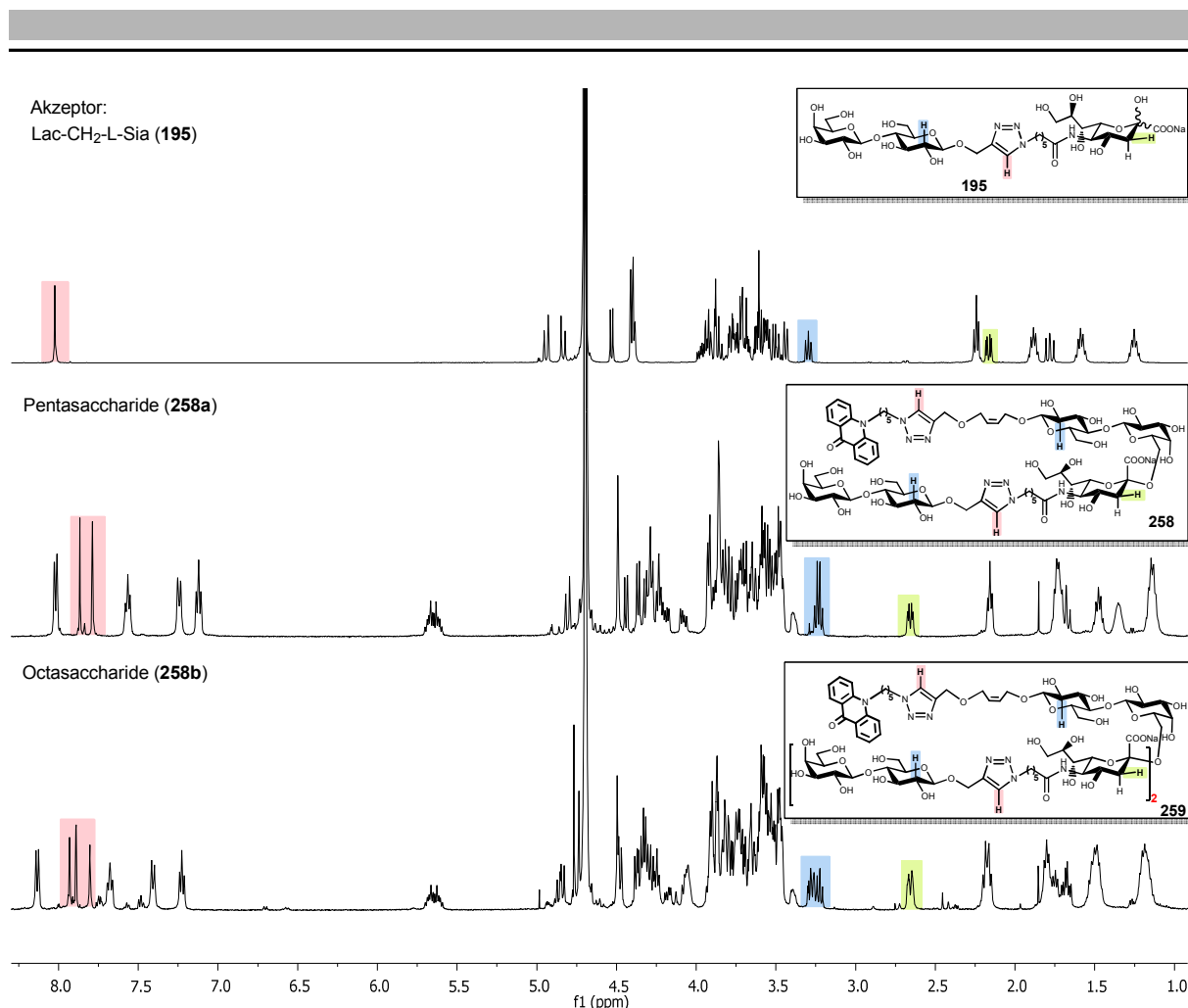


Abb. 89: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von Edukt **195** mit denen des synthetisierten Pentasaccharids **258a** und des Octasaccharids **258b**.

In einem zusätzlichen Kontrollexperiment wurde die mit dem Fluoreszenzmarker Cumarin gekoppelte CMP-Sialinsäure (**218**) in einem Eintopf/zwei-Enzym-Reaktionssystem nach Produktbildung der verschiedenen Sialopolysaccharide **258** aus Lac-CH₂-L-Sia (**195**) und Acridon-verlinktem Lactosid (**115**) zugesetzt, um freie glycosylierbare Lactosyl-Enden in den Oligosaccharidprodukten zweifelsfrei nachweisen zu können. Tatsächlich konnte dadurch ein weiterer Sialyltransfer von **218** auf den terminalen Lactose-Rest in dem synthetischen Pentasaccharid **258a** und Octasaccharid **258b** mittels DC-Kontrolle eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 90). Die CMP-Sialinsäure **218** wurde dem Reaktionssystem portionsweise zugegeben, da diese selbst gegen geringe pH-Wert-Absenkungen nicht stabil ist. Nach der Aufreinigung durch Chromatographie über RP-C18-Kieselgel konnten die gebildeten, doppelt fluoreszenzmarkierten Hexasaccharid **259a** und Nonasaccharid **259b** durch Maldi-TOF-MS detektiert werden (Abb. 91). Der Nachteil dieser Reaktionsfolge ist die Bildung eines

Nebenprodukts durch den Sialyltransfer von **218** direkt auf das restliche, in der Reaktionsmischung verbliebene Acridon-markierte Lactosid (**115**), was die Ausbeute schmälert und die Aufreinigung erschwert. Deswegen ist es vermutlich vorteilhafter, die präparative Synthese von **259a** und **259b** eher aus den isolierten Zwischenstufen **258a** und **258b** mit in situ hergestellter Cumarin-markierter CMP-Sialinsäure **218** im Eintopf/zwei-Enzym-System durchzuführen. Mit den erhaltenen doppelt fluoreszenzmarkierten Pseudo-Oligosaccharidprodukten ist das Spektrum verfügbarer Sialokonjugate für photophysikalische Untersuchungen damit um eine weitere Kombination von Fluorophoren ergänzt worden.

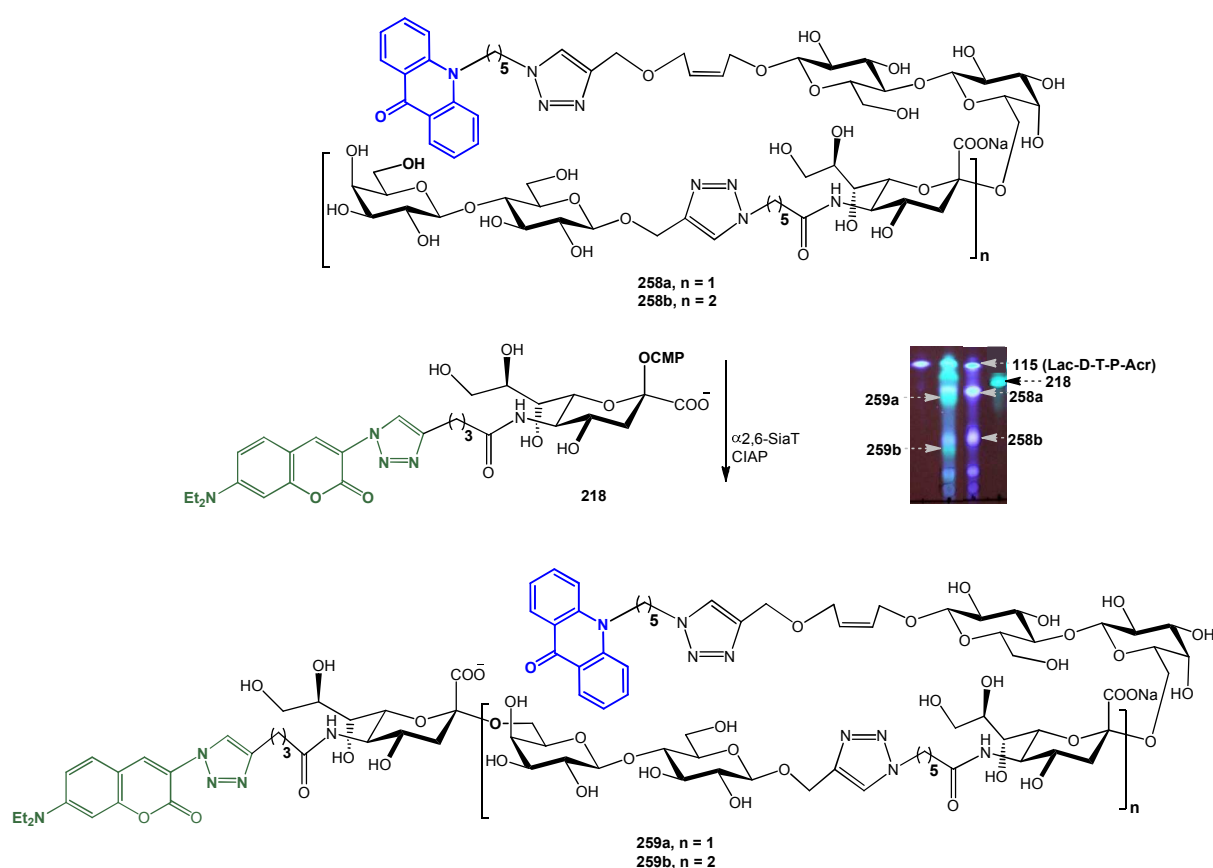


Abb. 90: Synthese doppelt fluoreszenzmarkierter Pseudo-Polysaccharide.

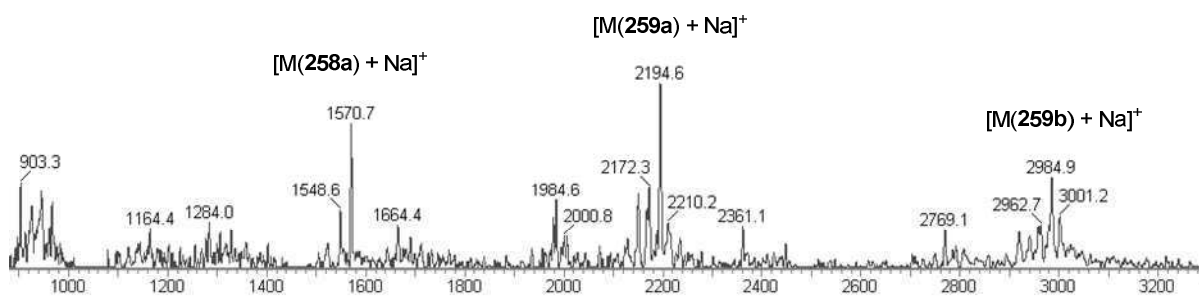


Abb. 91: Maldi-TOF-MS-Spektrum der doppelt fluoreszenzmarkierten Oligosaccharide.

Derartig doppelt fluoreszenzmarkierte Pseudo-Hexasaccharid-/Nonasaccharid-Verbindungen (**259a/259b**) mit energetisch unterschiedlich anregbaren Fluorophoren könnten dabei helfen, die Vorzugskonformationen solcher längerkettigen Pseudo-Oligosaccharide mit amidischen und *N*-heterocyclischen Linkeranteilen mit Hilfe von FRET-Untersuchungen näher aufzuklären.

Eine effizientere Synthese von strukturell definierten Sialooligosacchariden (wie z.B. **258/259**), speziell von längerkettigen fluoreszenzmarkierten Sialooligo- bzw. -polysacchariden, könnte vermutlich durch den Einsatz der CSS-Mutante F192A (siehe Kap. 3.2.4) erreicht werden, weil diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant höhere Katalyseeffizienz für mit größeren *N*-Acylgruppen modifizierte Neu5Ac-Derivate aufweist und daher möglicherweise auch für die mit sperrigen peracetylierten glycosidischen Sialylakzeptoren gekoppelten Sialinsäuren (**188/190/192/194**) effektiver in Wechselwirkung treten kann.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit neuartige Pseudo-Oligosaccharide mit sich wiederholenden Sialyllactose-Einheiten aus CSS-aktivierbaren Sialylakzeptor-gekoppelten Sialinsäuren erstmals auf rein enzymatischem Weg mit Hilfe der Kopplung von CSS und SiaT nach einer Eintopf/zwei-Enzym-Strategie hergestellt werden. Sowohl einfach, als auch doppelt fluoreszenzmarkierte Produkte (**258/259**) sind mit dieser Strategie gezielt herstellbar. Das Reaktionsprinzip entspricht einer sogenannten „enzymatischen Homo-Polymerisation“, das wegen der realen Freisetzung von CMP formal als Polykondensation von AB-reaktiven Monomeren einzustufen wäre.

Diese strukturell interessanten Oligosaccharid-Analoga mit internen Sialinsäurekonjugaten ergänzen den Pool bisher bekannter Sialokonjugat-Typen und könnten für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze wertvoll sein. Die erfolgreiche Synthese durch enzymatischen

Sialyltransfer dokumentiert darüberhinaus einen ungewöhnlichen Grad an Substrattoleranz der α 2,6SiaT aus *Photobacterium leiognathi*, der weitere vielversprechende Synthesevorhaben beflügeln sollte.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Sialinsäure und Sialinsäure enthaltende Strukturen spielen eine essentielle Rolle in den Zelloberflächen-Erkennungsmechanismen. Für die enzymatische Synthese von Sialylkonjugaten sind drei Schritte erforderlich: I) Synthese der Sialinsäuren mittels *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA) oder *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase (NeuS); II) Nucleotid-Aktivierung durch CMP-Sialat-Synthetase (CSS); III) Der Sialyltransfer auf einen Akzeptor mittels Sialyltransferase (SiaT). Dabei ist die CSS-Aktivierung ein wichtiger Zwischenschritt. Die CSS aus *Neisseria meningitidis* wurde bereits in vielen Arbeiten für die Aktivierung unterschiedlicher nicht-natürlicher Sialinsäuren verwendet. Ergänzend wurde in dieser Arbeit eine kinetische Quantifizierung der CSS-Wildtyp und von 6 *active site*-Mutanten mittels einer neu entwickelten kontinuierlichen pH-Assay-Methode für 12 verschiedene Sialinsäurederivate und Analoga untersucht. Um die kinetischen Resultate zu bestätigen und neuartige Sialokonjugate zu erhalten, wurden die verschiedenen Sialinsäuren präparativ nach in-situ-CSS-Aktivierung auf geeignete Sialyltransferase-Akzeptoren übertragen.

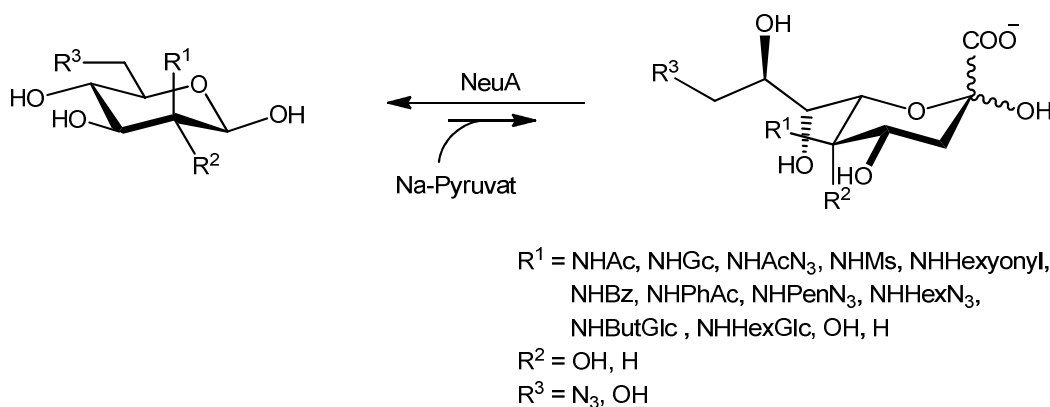
Säugerzelloberflächen werden durch Sialinsäuren mit hoher Dichte bedeckt, wo sie in vielen biologischen Prozessen eine bedeutende Rolle spielen. Modifizierung bzw. Fluoreszenzmarkierung der Sialinsäuren auf Zelloberflächen können diese biologischen Phänomene mittels Fluoreszenzmikroskopie in räumlicher Auflösung visualisieren. Für diesen Zweck wurden in dieser Arbeit die Synthesen von verschiedenen CMP-aktivierten fluoreszenzverlinkten Sialinsäuren für biologische Studien optimiert.

Sialopolysaccharide funktionieren in Zelloberflächen bestimmter pathogener Bakterien als Virulenzfaktoren. Da Sialopolysaccharide nur schwer aus natürlichen Quellen isolierbar sind, wurden aktivierbare Akzeptor-verlinkten Sialinsäuren hergestellt, um damit SiaT-katalysierte Blockpolymerisationen zu strukturell definierten Sialopolysacchariden zu ermöglichen.

4.1. Enzymatische Synthese von Sialinsäuren

Die benötigten C9- und C5-modifizierten Sialinsäuren sowie die desaminierte Sialinsäure KDN wurden mit der kommerziellen *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA) aus den entsprechenden Man- oder ManNAc-Derivaten durch stereoselektive Addition von Na-Pyruvat im präparativen Maßstab hergestellt. Hierbei wurden erstmals die Glucose-konfigurierten ManNAc-Derivate bzw. das mit einer N₃-Gruppe an C2- und C6-Position doppelt modifizierte

ManNAc-Derivat durch NeuA zu den entsprechenden Sialinsäuren umgesetzt. Die verkürzten Neu5Ac-Homologen mit C7/C8-Kettenlänge (C7-/C8-Neu5Ac) wurden aus Neu5Ac durch chemischen oxidativen Abbau erhalten.

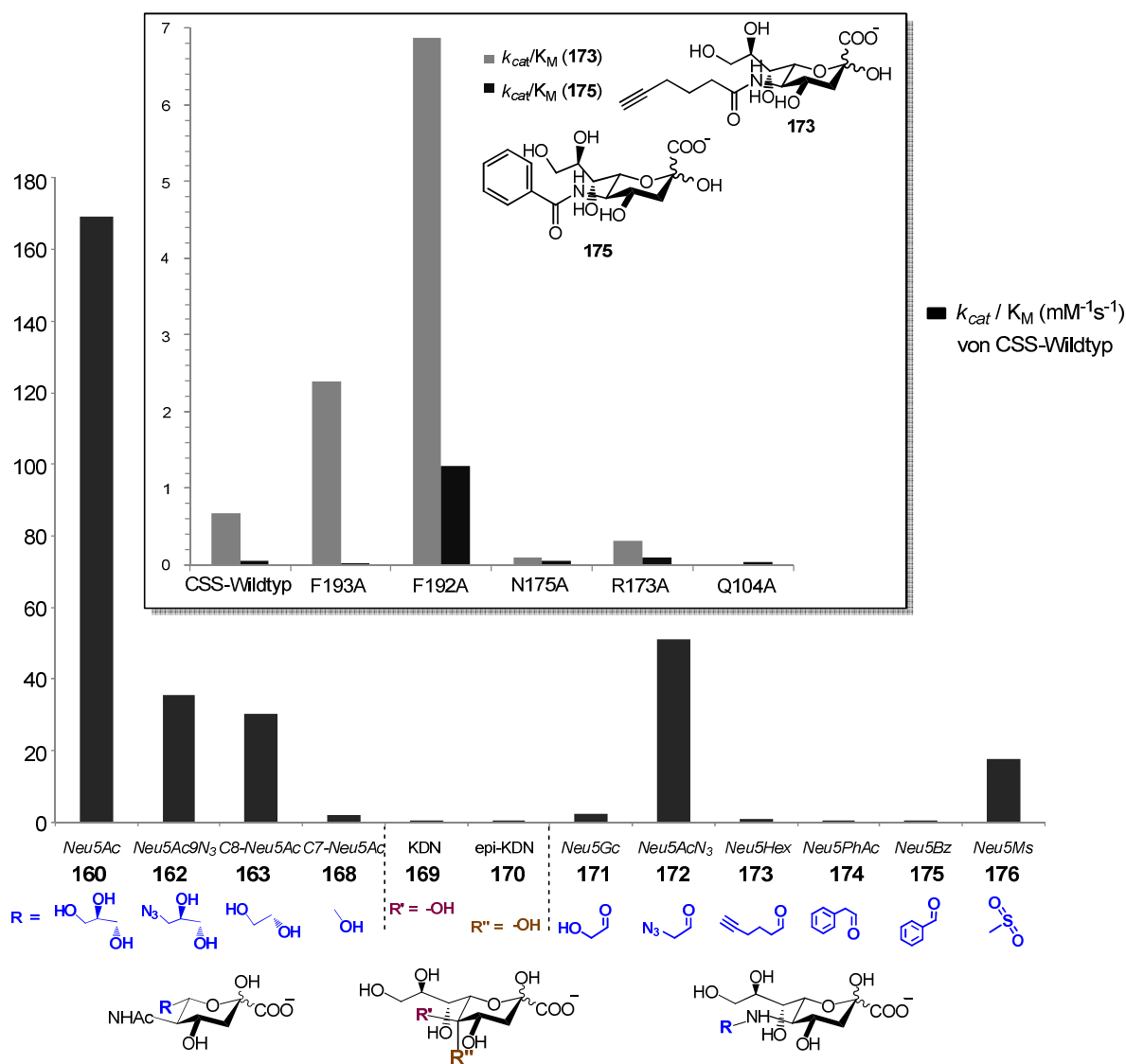


4.2. Entwicklung einer neuen kontinuierlichen Assay-Methode für die CMP-Sialat-Synthetase

Die CSS aus *Neisseria meningitidis* Serogruppe B katalysiert die Nucleotid-Aktivierung von Sialinsäuren unter Verbrauch von CTP in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen als Kofaktor. Während jedes Reaktionszyklus der CSS-Aktivierung wird formal ein Proton freigesetzt, welches mit Hilfe der Farbveränderung eines pH-Indikators kontinuierlich photometrisch gemessen werden kann. Trispuffer mit einer Konzentration von 2 mM (pH = 8.6) und Kresolrot als Indikator wurden für die Assay-Methode aus folgenden Gründen gewählt: 1) Die optimale CSS-Aktivität liegt bei pH 8.5 in Trispuffer. Die Farbänderung des Reaktionssystems ohne Puffer ist bei minimalen Bedingungsänderungen sehr leicht, tritt jedoch im Puffer mit hoher Konzentration nicht mehr auf. Deswegen wurde die Pufferkonzentration von 2 mM angewendet. 2) Kresolrot als Indikator hat einen hohen Absorptionskoeffizienten und mit den CSS-Aktivierungsreaktionen übereinstimmen pH-Umschlagsbereich. 3) Trispuffer und Kresolrot haben ähnliche pK_a -Werte, was eine proportionale Beziehung zwischen der Absorptionsänderung und der Reaktionszeit ermöglicht. Nach diesem Prinzip wurde hier eine neue sensible kontinuierliche Assay-Methode entwickelt. Diese Methode ist schneller, preiswerter, einfacher und sensitiver als bisher bekannte Assays und gut für quantitative kinetische Messungen verwendbar.

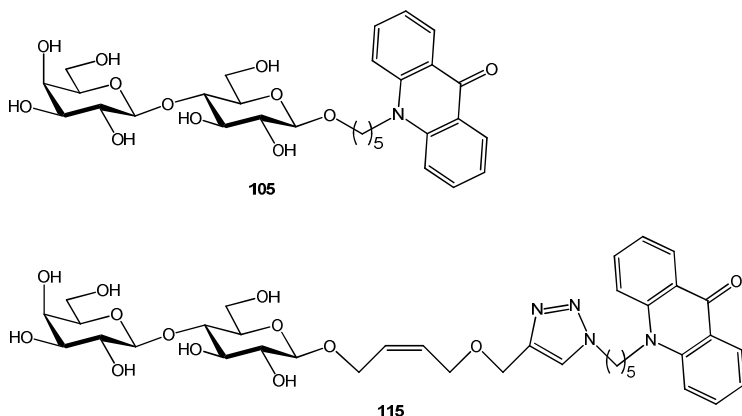
Mit Hilfe dieser neuen pH-Assay-Methode wurden die kinetischen Parameter bestimmt für insgesamt 12 verschiedene natürliche und nicht-natürliche Sialinsäuren inklusive Neu5Ac, C9- N_3 -modifizierte Neu5Ac, Ketten-verkürzte Neu5Ac-Analoga, unterschiedlich C5-modifizierte

Neu5Ac und desaminierte Substrat-Analoga KDN und deren 5-Epimer. Außerdem wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Berry (*University Leeds, England*) die kinetischen Eigenschaften von 6 CSS-Mutanten (F192A, F193A, R173A, N175A, Q104A und D209A) durch den neu entwickelten pH-Assay untersucht. Im Vergleich zum CSS-Wildtyp zeigte F192A die höchste katalytische Effizienz für C5-modifizierte Sialinsäuren mit unpolen Gruppen wie *N*-Hexinoyl- oder *N*-Benzoyl-Derivaten. Deswegen ist die CSS (F192A) besonders für die effiziente präparative Aktivierung von derartigen nicht-natürlichen Sialinsäuren geeignet.

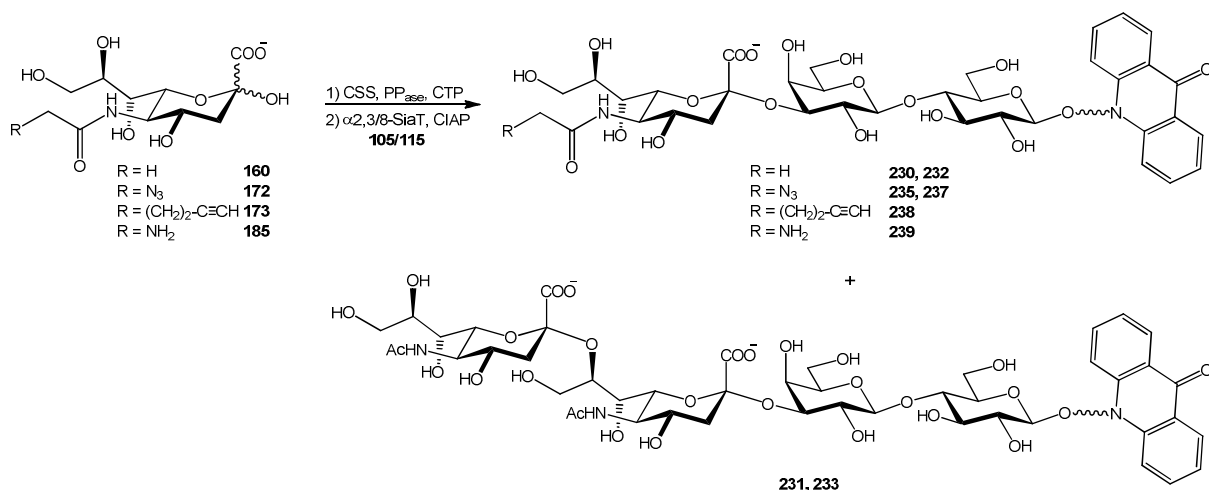


4.3. Enzymatische Synthese von neuartigen Sialokonjugaten mittels Kaskaden-Reaktionen

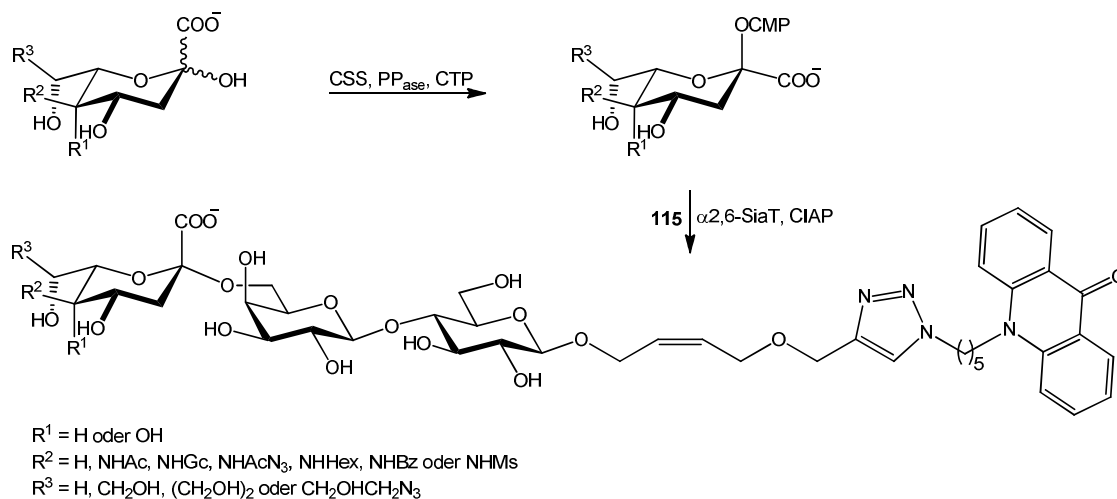
Mit Hilfe von Sialyltransferasen (SiaT) wurden die verschiedenen quantitativ in situ aktivierten Sialinsäuren auf einen Sialyltransferase-Akzeptor übertragen, um die neuartigen Sialokonjugate für eine vollständige Charakterisierung präparativ herzustellen. Als Sialyltransferase-Akzeptoren wurden die chemisch hergestellten Acridon-verlinkten Lactoside (**105**, **115**) verwendet, da der Acridon-Anker früheren Untersuchungen zufolge sich als besonders stabil und hoch empfindlich detektierbar erwiesen. Außerdem konnten die Acridon-verlinkten Sialokonjugate durch Chromatographie an RP-C18-Kieselgel leicht in hoch reiner Form isoliert werden.



Die zunächst verwendete α 2,3-SiaT aus *Campylobacter jejuni* (CstII Δ 32) ist bifunktionell und hat eine zusätzliche α 2,8-SiaT-Aktivität. Daher wurde Neu5Ac nicht nur auf fluoreszenzmarkierte Lactoside (**105/115**) als α 2,3-Konjugat (**230/232**), sondern auch weiter auf das entstehende α 2,3-Produkt als α 2,8-Konjugat (**231/233**) übertragen. Die Ausbeute der beiden Produkte konnte durch die Variation der Molverhältnisse zwischen Sialinsäure und Akzeptor gesteuert werden. Für die C5-modifizierten Neu5Ac-Derivate (**172**, **173**, **185**) wurden die α 2,3-Sialokonjugate noch selektiver als Hauptprodukte produziert und die doppelt sialylierten Produkte nur noch per DC als schwachen Spot beobachtet, letztere konnten jedoch nicht mehr isoliert werden.



Mittels einer kürzlich beschriebenen α2,6-SiaT aus *Photobacterium Leiognathi* JT-SHIZ-145, deren Aktivitätsmaximum vorteilhaft im mild alkalischen Milieu liegt, wurden zehn neuartige fluoreszenzmarkierte α2,6-Sialokonjugate synthetisiert durch Transfer der entsprechend in situ aktivierten Sialinsäuren auf das Acridon-gekoppelte Lactosid (115). Die Produkte konnten durch sequentielle Säulenchromatographie über BioGel P2 und RP-C18-Kieselgel in hoch reiner Form mit Ausbeuten von 75-98% isoliert und mittels NMR und ESI-MS eindeutig charakterisiert werden.

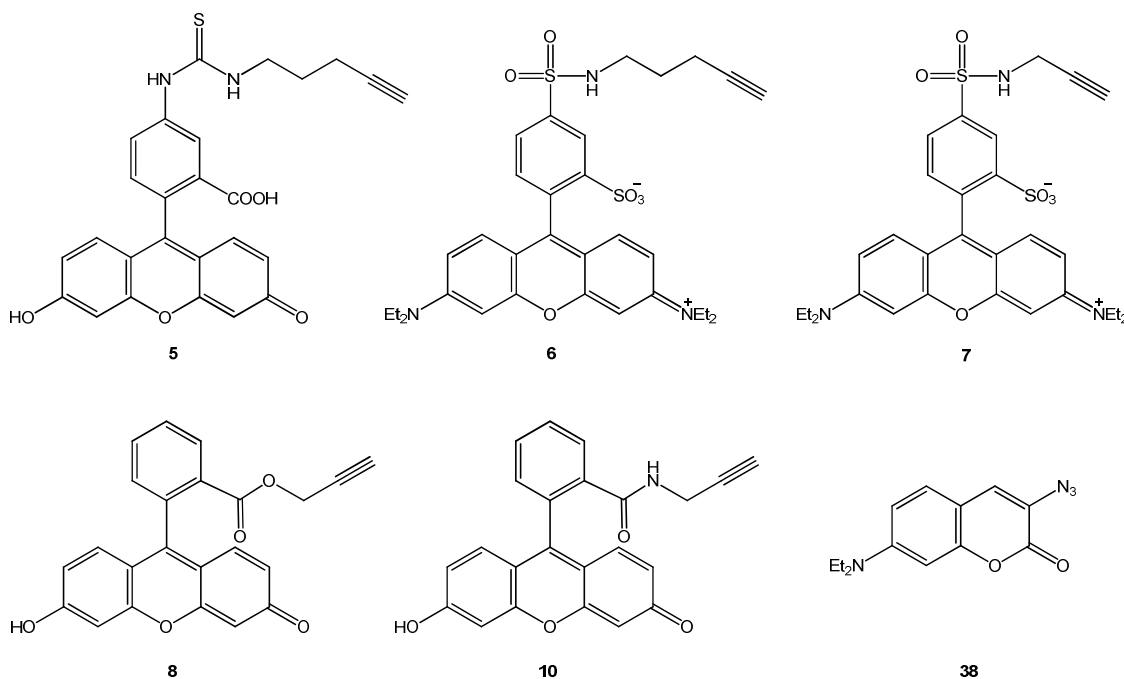


4.4. Herstellung fluoreszenzmarkierter Erythrozyten

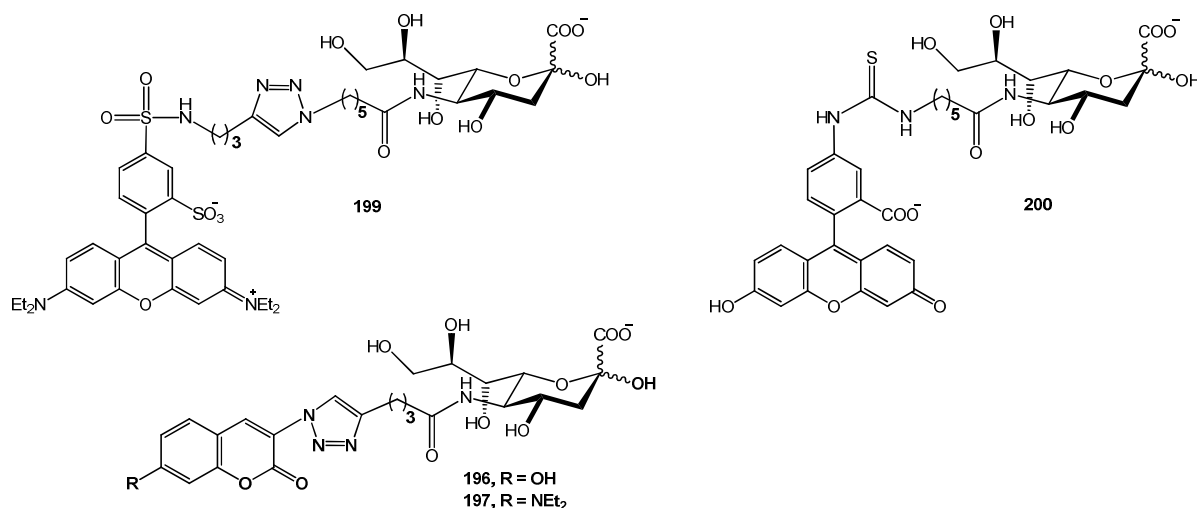
Für die enzymatische Synthese der fluoreszenzmarkierten Glycoproteinen oder Glycolipiden auf Zelloberflächen sollen die Zelloberflächen zunächst durch Neuraminidase desialyliert. Die kommerzielle Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* kann die Hydrolyse von terminalen α2,3-, α2,6- und α2,8-verlinkten Neu5Ac-Resten aus Glycoproteinen an Zelloberflächen

katalysieren und wurde hier für die Desialylierung der Erythrozyten (Sialinsäure-reiche Zellen) verwendet. So frei werdende Galactosereste können prinzipiell resialyliert werden. Im Falle von fluoreszenzmarkierten Sialinsäuren würde dann die Zelloberfläche mit Hilfe von SiaT mit Fluoreszenzlabeln belegt.

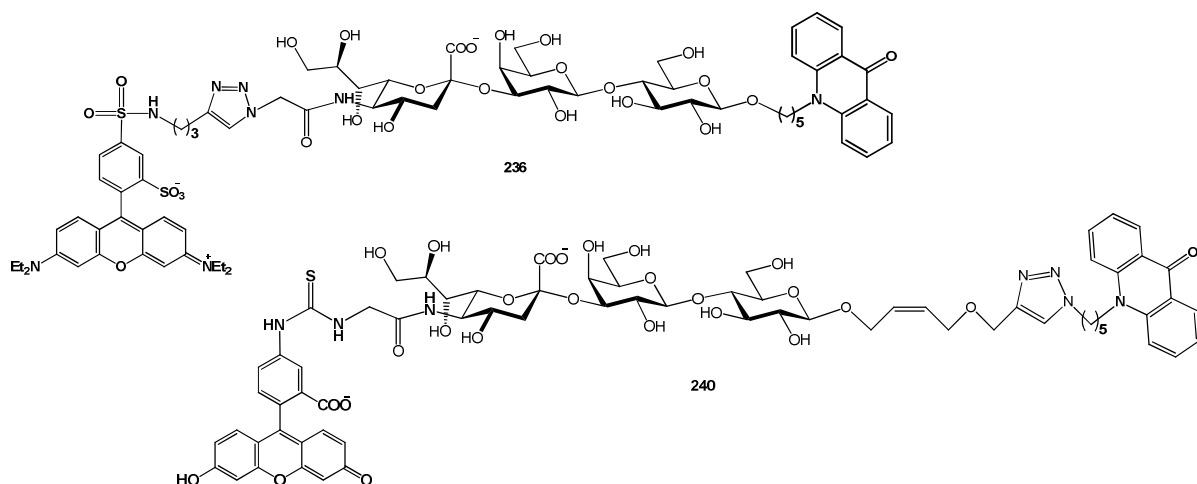
Um die Sialinsäuren mit Chromophoren zu verknüpfen, wurden zuerst verschiedene mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen, wie z.B. Alkin oder Azid, gekoppelten Chromophore Alkin-verlinktem Rhodamin/FITC/Fluorescein (**5-8, 10**) oder Cumarin-N₃ (**38**) chemisch synthetisiert.



Für einen effizienten Sialyltransfer wurden hier die Synthesen von CSS-aktivierbaren Sialinsäuren mit den verschieden farbigen Fluoreszenzchromophoren Cumarin-, FITC- oder Rhodamin-Linkern untersucht und optimiert. Es wurde gefunden, dass die resultierenden fluoreszenzgekoppelten Sialinsäuren (**196, 197, 199, 200**) durch CSS fast quantitativ aktiviert werden konnten, wenn der Linker zwischen Chromophor- und Sialinsäure-Rest lang genug ist (mehr als 3 bzw. 5 CH₂-Gruppen).

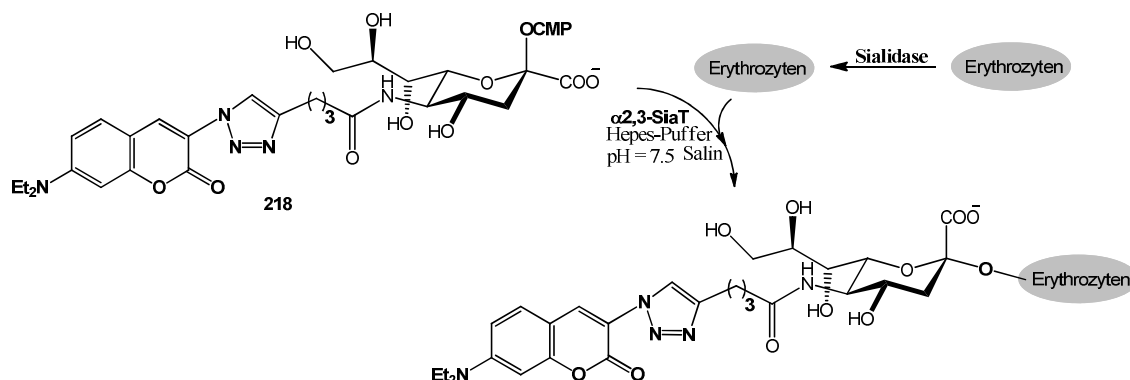


In Vorversuchen haben wir hier zuerst die doppelt fluoreszenzmarkierten Sialokonjugate **236** und **240** in vitro chemoenzymatische hergestellt. Das Sialokonjugat **236** konnte aus dem Alkin-verlinkten Chromophor **6** und dem Azid-modifizierten, Acridon-markierten Sialokonjugat **235** mittels Click-Reaktion in guter Ausbeute hergestellt werden. Das zweite doppelt fluoreszenzmarkierte Sialokonjugat **240** wurde durch eine Kaskaden-Strategie mit einer Gesamtausbeute von 47% synthetisiert, in der das Amin-modifizierte, Acridon-markierte Sialokonjugat **239** in situ in einem Ein-Topf-Zwei-Enzym-System mittels der zwei Enzyme CSS und α 2,3-SiaT aus Amin-gekoppelter Sialinsäuren **185** enzymatisch synthetisiert und anschließend mit FITC chemisch zum Produkt **240** verknüpft wurde.



CMP-aktivierte Cumarin-verlinkte Sialinsäuren wurden präparativ enzymatisch hergestellt und mittels α 2,3-SiaT (CstIIA32) auf mit Sialidase vorbehandelte Erythrozyten-Oberflächen übertragen. Die fluoreszenzmarkierten Erythrozyten konnten zwar im Fluoreszenzmikroskop bei 450 nm detektiert werden, jedoch blieb die Fluoreszenzintensität der Zelloberfläche hinter

der Erwartung zurück. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Zersetzung des Cumarin-verlinkten Sialyltransferase-Donorsubstrats **218** während der Resialylierung bei pH 7.5 sein.

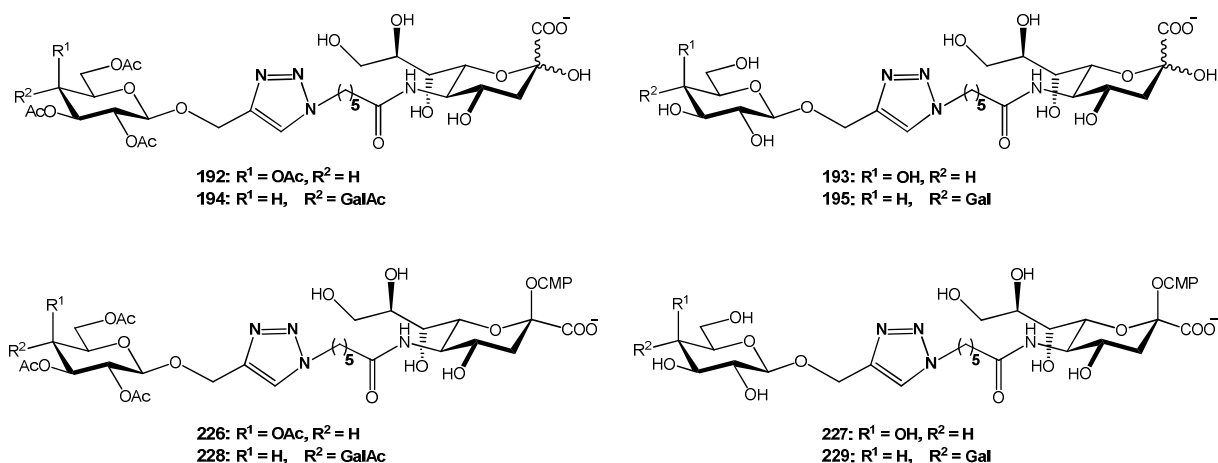


Bessere fluoreszierende Zellen können möglicherweise erhalten werden, wenn der Sialyltransfer mit stärker fluoreszenzaktiven CMP-Sialinsäuren (z.B. CMP-aktivierter Form aus **199**) mittels Kombination aus α 2,3- und α 2,6-SiaT durchgeführt wird. Die Vermeidung der Zersetzung von Chromophor-verlinkter CMP-Sia könnte zudem durch eine alternative Strategie erreicht werden, wenn sich das Chromophor nach dem Sialyltransfer von stabilerer CMP-Sia auf der Zelloberfläche mittels Staudinger-Ligation oder kupferfreier Cycloadditions- und Ligation auf der Zelloberfläche koppeln ließe.

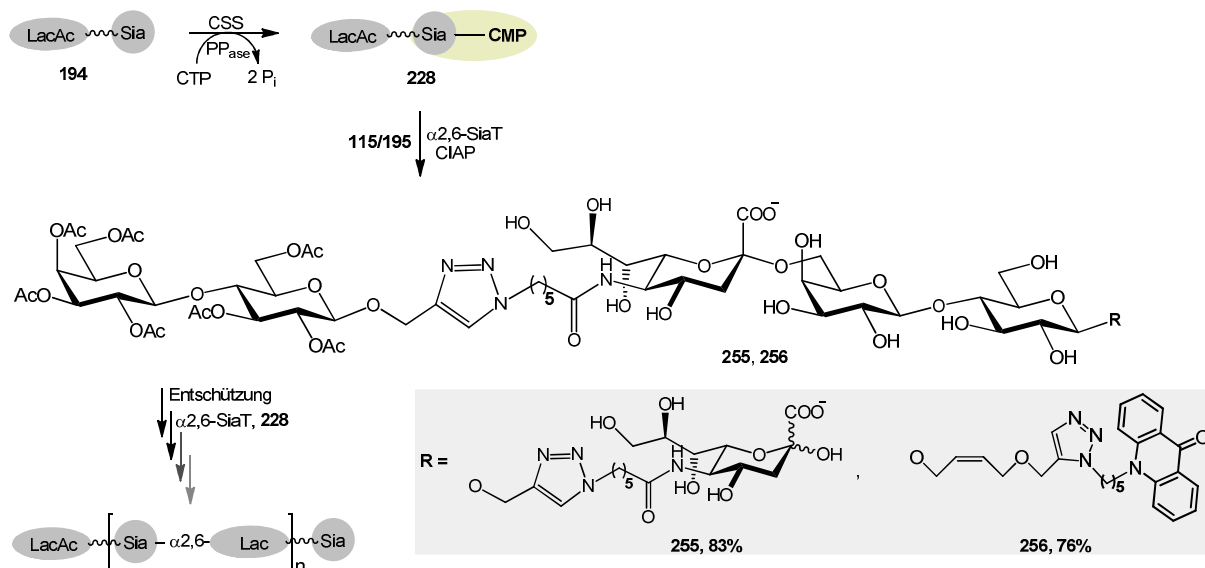
4.5. Blockpolymerisation in Ein-Topf-zwei-Enzym-System

Für eine Blockpolymerisation mittels Glycosyltransfer ist die Herstellung einer CSS-aktivierbaren Galactosid-gekoppelten Sialinsäure eine Voraussetzung, da in solchen Konstrukten die CMP-Sia-Reste als Sialyltransferase-Donor und die Lac/Gal-Reste als Sialyltransferase-Akzeptor verwendet werden können, wodurch beide Enden verlängerbar sind.

Hierfür wurden die mit Galactosid oder Lactosid modifizierten Sialinsäuren **192-195** entwickelt, die durch CSS zu den entsprechenden CMP-Sialinsäuren **226-229** nahezu quantitativ aktiviert werden konnten.

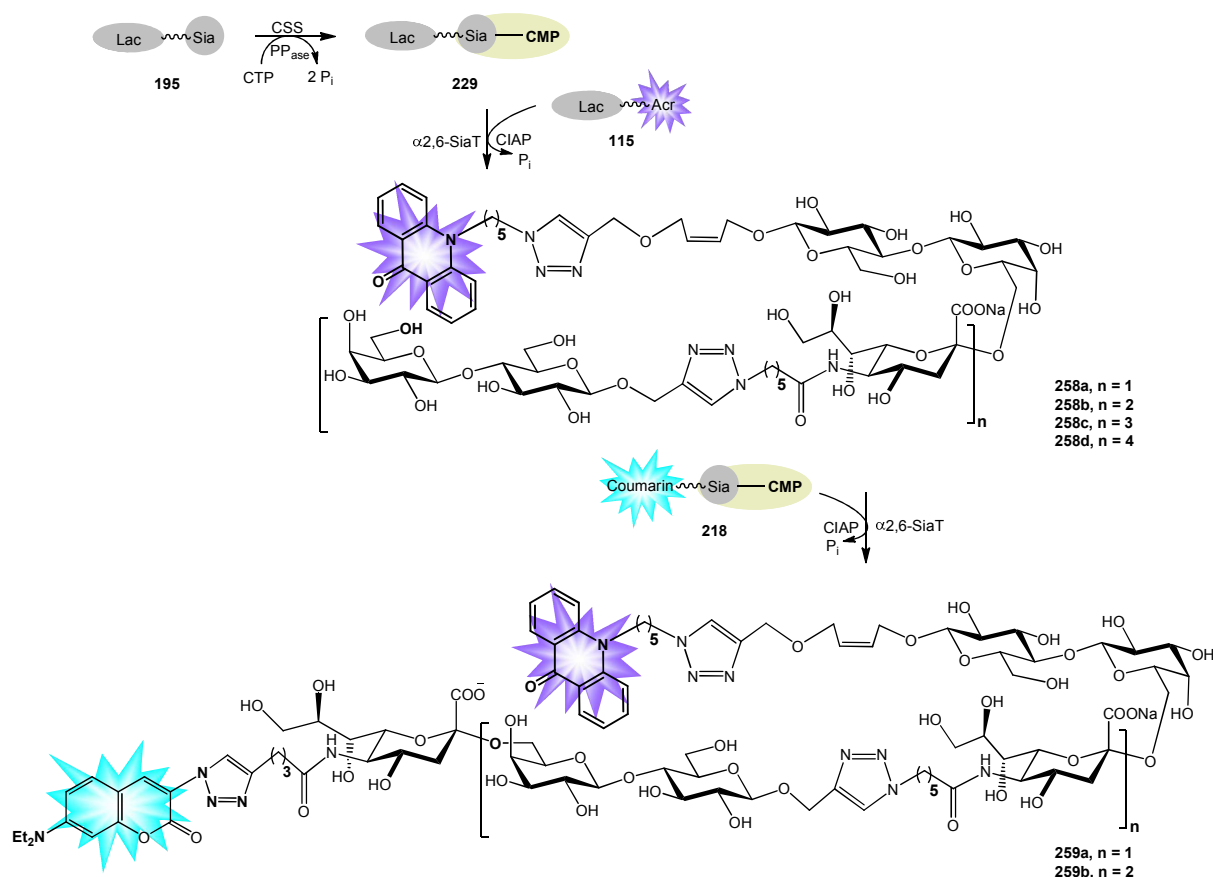


Die mit geschütztem Lactosid verknüpfte Sialinsäure **194** wurde nach ihrer Aktivierung durch α 2,6-SiaT-Katalyse auf das mit Sialinsäure gekoppelte ungeschützte Lactosid **195** oder auf den fluoreszenzmarkierten Lactosid-Akzeptor **115** übertragen. Die erhaltenen Oligosaccharide **255** und **256** können nach der Entschützung wieder mit der acetylierten Lactosid-verlinkten CMP-Sialinsäure (**228**) mittels Sialyltransferase weiter reagieren, wobei zukünftig durch Wiederholung dieses Prozesses (Entschützung und Sialyltransfer) die Herstellung von größendefinierten Sialooligosacchariden möglich wird.



Aus der mit ungeschütztem Lactosid verlinkten Sialinsäure **195** wurden Sialooligosaccharide durch unkontrollierten, repetitiven Glycosyltransfer mittels CSS und α 2,6-SiaT in einem Ein-Potf-zwei-Enzym-System hergestellt. Um die Blockpolymerisation analytisch leichter verfolgen und die verschiedenen synthetisierten Oligosaccharide ohne Probleme isolieren zu können, wurde daneben auch Acridon-gekoppeltes Lactosid **115** als zusätzlicher Sialyltransferase-Akzeptor in das Blockpolymerisationsexperiment eingesetzt. Die Produkte

mit ein bis vier α 2,6-Sialyllactosid-Wiederholungseinheiten (**258a-258b**) wurden mittels Maldi-TOF MS-Analysen eindeutig nachgewiesen. Um die Regio- und Stereospezifität des Sialyltransfers zu bestimmen, wurden die beiden Produkte Pseudo-Pentasaccharid **258a** und Pseudo-Octasaccharid **258b** präparativ selektiv hergestellt und NMR-spektroskopisch identifiziert. Zudem gelang es, durch die Zugabe eines zweiten Sialyl-Donorsubstrats, nämlich des Coumarin-gekoppelten CMP-Sia **218**, nach der Blockpolymerisation die doppelt fluoreszenzmarkierten Sialooligosaccharide **259a** und **259b** zu synthetisieren.



Die Aktivierung der Glycosid-verlinkten Sialinsäuren ist der entscheidende Schritt für den Erfolg der Blockpolymerisation zur Herstellung der Sialopolysaccharide. Zwar konnten die Glycosid-verlinkten Sialinsäuren **191-194** quantitativ aktiviert werden, jedoch mussten dabei große Mengen des Wildtyp-Enzyms CSS eingesetzt werden. Möglicherweise kann eine effiziente Aktivierung von **191-194** besser mit Hilfe der CSS-Mutante F192A erreicht werden, da diese im Vergleich die beste Katalyseeffizienz für die Aktivierung von C5-modifizierten Sialinsäuren mit großen, unpolaren Gruppen gezeigt hatte.

5. Experimenteller Teil

5.1. Allgemeine Bemerkungen

NMR-Spektroskopie

^1H -NMR: 300 MHz Bruker DRX 300

500 MHz Bruker DRX 500

^{13}C -NMR: 75.4 MHz Bruker DRX 300

125.8 MHz Bruker DRX 500

Die chemischen Verschiebungen sind relativ zum internen Standard Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0$ ppm) in ppm, alle Kopplungskonstanten in Hz angegeben. Bei der Zuordnung stehen s für singulett, d für dublett, t für triplett, q für quartett und m allgemein für multiplt.

Massenspektren

Elektronensprayionisation (ESI): Bruker-Franzen Esquire LC Massenspektrometer

Maldi-TOF MS: Micromass TOFSPEC E with pulsed N_2 -Laser (4 ns), Software: Micromass MassLynx V2.3

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Kontrolle des Reaktionsverlaufs und der Reinheit der Produkte:

Kieselgelfolien auf Aluminium 60 F₂₅₄, Merck KGaA, Darmstadt

Um die Flecken von Substanzen auf DC-Blättern zu identifizieren, wurden folgende Methoden dazu verwendet:

UV-Absorption bei 254 nm

Fluoreszenz-Anregung bei 366 nm

Färbereagenzien: Anisaldehyd-Reagenzien (200 mL EtOH, 5.5 mL Anisaldehyd, 7.5 mL konz. H₂SO₄, 2.2 mL AcOH); Ninhydrin- Reagenzien (1 g Ninhydrin,

Säulenchromatographie

Kieselgel 60, Korngröße 40-63 µm, *Fa. Merck*

Kieselgel 60, Korngröße 63-200 µm, *Fa. Merck*

Kieselgur Celite 533, *Fa. Fluka*

Kieselgel 100 C18-Umkehrphase, Korngröße 40-63 µm, fully uncapped, *Fluka*

Bio Gel P-2fine, Korngröße 65 ± 20 µm, *BioRad*

Dowex 50 WX8 pract. (H⁺-Form, 100-200 mesh), *Fa. Serva*

Proteinchromatographie

Säulen: SuperFlo[®] 50, *Fa. Sephagen*

Füllmaterial: Sepharose CL-6-B, *Pharmacia*

Gefriertrocknung

Lyovac GT 2, *Steris*

Fermente

Biostat[®]B, *Fa. B.Bralin*

Zentrifugen

Biofuge 28 RS, *Heraeus Sepatech*

Centrifuge 5415 R, *Eppendorf*

Ultrafiltration

Amicon 8400, Membran: YM 10 (MWCO: 10 kDa), *Amicon*

pH-Meter

Minitrode, *Hamilton*

pH-Elektrode, *VWR*

Photometer

UV-1800 (UV Spectrophotometer), *Shimadzu*

V-560 (UV/VIS Spectrophotometer), *Jasco*

Verwendete Enzyme

EC 2.7.7.43 CMP-Sialat-Synthetase aus *Nesseria meningitidis* serogroup B

EC 3.1.3.1 alkalische Phosphatase aus *Rinderdarmschleimhaut* 1649 U/mg, CIAP, Fluka

EC 3.6.1.1 anorganische Pyrophosphatase aus *Bäckerhefe* 1280 U/mg, Ppase, Sigma

EC 4.1.3.3 Neuraminsäure-Aldolase 22.1 U/mg, NeuA, Sorachim

EC 2.4.99.1 α -2,6-Sialyltransferase aus *Photobacterium Leioognathi* JT-SHIZ-145

EC 2.4.99.4 α -2,3-Sialyltransferase aus *Campylobacter jejuni* (*CstII* gene)

EC 3.2.1.18 Neuraminidase aus *Closterdium Perfringens* 50000 U/mL, BioLabs_{inc}

5.2. Herstellung der CMP-Sialat-Synthetase (CSS)

5.2.1. Fermentation

Für die Fermentation werden zuerst die Bakterien einer Dauerkultur auf einer LBA-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert, dann wird eine 200 mL Schüttelkultur mit einem Klon beimpft und bei 37 °C mit einer Geschwindigkeit von 180 rpm für 16 Stunden geschüttelt. Danach wird mit dieser Übernachtskultur ein Fermenter mit einem

Gesamtvolumen von 7 L bei 37 °C mit einer Drehzahl von 600 rpm und Luftdurchsatz von 6 L/min in TB-Medium (12 g Tripton, 24 g Hefeextrakt, 4 mL Glycerin, 100 mL 10 x Phosphatpuffer: 0.17 M KH_2PO_4 , 0.72 M K_2HPO_4 pro Liter) beimpft. Sobald die Kultur eine Trübung „OD₆₀₀“ von 0.8~1.0 zeigt, wird IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0.5 mM zum Fermenter zugegeben, um die Zellen zu induzieren. Nach 4~5-stündigem Kultivieren werden die Zellen durch eine kontinuierlich laufende Zentrifuge bei 6000 g bei 25 °C geerntet. Es wird eine Biomasse mit einem Feuchtgewicht von ca. 150 g erhalten. Die Zellpellets werden bis zum Zellaufschluss bei –20 °C gelagert.

5.2.2. Zellaufschluss

Um die Zellen aufzuschließen, werden 80 mL Glasperlen (0.1-0.2 mm) mit 60 mL einer 50% igen Zellsuspension (w/v) im Puffer A (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl_2 , 0.02 mM DTT) vermischt und 20 min mittels einer Kugelmühle bei 0 °C und 4000 rpm gerührt. Anschließend wird der Zellaufschluss 10 min bei 4°C und bei 16000 g zentrifugiert. Der so erhaltene geklärte Rohextrakt wird direkt für die weitere Reinigung eingesetzt. Zellen aus einer Zellsuspension kleiner als 50 mL können durch Ultraschall während 3~5 min bei 0 °C und maximaler Geräteleistung aufgeschlossen werden.

5.2.3. Reinigung der CSS

Abhängig von der terminalen Sequenz der CSS wird das Protein entweder mit Hilfe der Proteinchromatographie an Sepharose (CSS ohne His-Tag) oder mittels der Metallchelate-Affinitätschromatographie an einer Nickel-NTA Säule aufgereinigt (CSS mit His-Tag).

Proteinchromatographie an Sepharose

Nachdem die SuperFlo[®] 50-Säule mit 2 L Puffer A (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl_2 , 0.02 mM DTT)äquiliert wurde, wird der aufgeschlossene Rohextrakt (CSS ohne His-tag in Puffer A) auf die Säule aufgebracht. Als Waschpuffer wird 50 mM NaCl enthaltende Pufferlösung A verwendet, um die Fremdproteine aus zu spülen. Das gewünschte Enzym wird dann durch einen linearen Salzgradienten (50-300 mM NaCl im Puffer A) bei einer Flußrate von ca. 600 Tropfen/Fraktion eluiert. Die Enzym enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Bei der Ultrafiltration wird der Puffer A mit Salz gegen Puffer A getauscht. Die konzentrierte EnzymLösung wird dann gefriertrocknet und bei – 20°C aufbewahrt.

Metallchelate-Affinitätschromatographie an Nickel-NTA Säule

Für die Aufreinigung von CSS mit His-Tag wird die Metallchelate-Affinitätschromatographie an einer Nickel-NTA Säule verwendet. Ni^{2+} - Ionen werden von dem vierzähligen Liganden Nitrilo-triacetat an Sepharose immobilisiert und verfügen jeweils über 2 freie Bindungsstellen für die reversible Bindung des unprotonierten Imidazolstickstoffs der Histidinamino-säure. Bevor die Protein-Probe im 40 mM Imidazol enthaltenden Puffer B (20 mM Phosphatpuffer, 500 mM NaCl, pH = 7.4) auf die Nickel-NTA-Sepharose Säule aufgebracht wird, wird die Säule durch den Puffer B äquilibriert. Als Waschpuffer wird 50 mM Imidazol enthaltender Puffer B verwendet, um die unspezifisch gebundenen Proteine von der Ni-NTA-Säule auszuwaschen. Die gebundene His-getagten CSS wird anschließend im Puffer B, mit 250 mM Imidazol, eluiert. Die sauberen Fraktionen mit dem gewünschten Enzym werden gesammelt. Durch Ultrafiltration wird die verwendete Pufferlösung gegen Puffer A getauscht. Nach dem Gefriertrocknen im Lyovac GT 2 wird die CSS als weißes Pulver erhalten und für weitere Anwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

5.3. Kinetische Analyse der CSS mittels pH-Indikator-Assay

5.3.1. Optimale Wellenlänge und benötigte Indikator-Konzentration

Für die Bestimmung der optimalen Wellenlänge wird jeweils 15 μL Kresolrot-Lösung (1mg/mL in 20% EtOH) mit 0.1 M HCl und 0.1 M NaOH bis zu einem gesamten Volumen von 1 mL in der Küvette gemischt. 1 mL H_2O dient als Blind-Probe. Die Absorptionsspektren der beiden Mischungen werden bei Wellenlängen von 200 bis 700 nm untersucht.

Für die Untersuchung der benötigten Kresolrot-Konzentration wird eine Messung mit verschiedenen Konzentrationen von Kresolrot in Tris-Puffer (2 mM Tris, 10 mM MgCl_2 , pH = 8.6) bei 37°C durchgeführt. Jede Messung wird fünf- bis zehnmal wiederholt.

5.3.2. Zusammenhang zwischen Entstehung von Protonen und Absorptions-änderung

Um die Aktivität von Enzymen mit Hilfe der pH-Wert-Änderung zu berechnen, wird der Zusammenhang zwischen der Entstehung von Protonen und der dadurch beobachteten Änderung der Absorption mittels einer HCl-Konzentrationsreihe bestimmt. Die Konzentration

von HCl in 2 mM Tris-Puffer (pH = 8.6) variiert von 0 bis 1.3 mM in Schritten von 0.1 mM. 12 μ L Neu5Ac (100 mM), 60 μ L MgCl_2 (100 mM), 6 μ L Kresolrot (2.6 mM) werden mit der HCl-Lösung der entsprechenden Konzentration in der Küvette bis zu einem gesamten Volumen von 600 μ L aufgefüllt und gut gemischt. Die Messwerte werden nach 10 s abgelesen. Die Messung wird für jede H^+ -Konzentration dreimal wiederholt und die Werte gemittelt.

5.3.3. Optimale Konzentration des Mg^{2+} -Cofaktors

Neu5Ac, MgCl_2 , 6 μ L CSS und 6 μ L Kresolrot (1 mg/mL in 20% EtOH) wurden nacheinander in 2 mM Tris-Puffer gegeben. Die Konzentrationen von Neu5Ac und Kresolrot in der Reaktionsmischung sind 3 mM und 0.026 mM. Die MgCl_2 -Konzentration variiert von 0, 2, 5, 10, 15 bis 20 mM. Die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion gegen die Zeit wurde bei 37 °C und bei 574 nm in einem gesamten Volumen von 600 μ L nach Zugabe von CTP (5 mM) gemessen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt und die gemessenen Werte gemittelt.

5.3.4. Bestimmung von Bindungsaffinitäten

Kinetik-Messung von CSS für CTP

Für die Bestimmung der kinetischen Daten von CTP bleiben die Endkonzentrationen von Neu5Ac, MgCl_2 und Kresolrot bei 3, 10 und 0.026 mM. Die Konzentration von CTP wird variiert, von 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.6, 0.8 bis 0.9 mM. Die Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Zeit wurde bei 37 °C und einer Wellenlänge von 574 nm nach der Zugabe von CTP in die Reaktionsmischung gemessen. Die kinetischen Daten K_M und k_{cat} werden durch die *Michaelis-Menten* Gleichung berechnet.

Kinetik-Messung von CSS für Neu5Ac und seine Derivate

Die kinetischen Daten von CSS für Neu5Ac und seine verschiedenen Derivate werden unter ähnlicher Reaktionsbedingungen wie für CTP bestimmt. Die Konzentration von CTP in der Reaktionsmischung bleibt konstant bei 0.5 mM und die Konzentration der Substrate wird variiert, z.B. variiert die Konzentration von Neu5Ac von 0.03 mM bis 3.0 mM. (Tabelle 13) Die kinetischen Daten K_M und k_{cat} werden ebenfalls durch die *Michaelis-Menten* Gleichung ermittelt.

Tabelle 13: die Konzentrationsbereiche der verschiedenen Substrate für die kinetische Messung

Substrat	Neu5Ac	Neu5Ac-9N ₃	C8-Neu5Ac	C7-Neu5Ac	KDN
Konzentration-Bereich (mM)	0.03 ~ 3.0	0.1 ~ 3.0	0.1 ~ 2.0	0.01 ~ 2.0	4.0 ~ 70
Substrat	epi-KDN	Neu5Gc	Neu5AcN ₃	Neu5Hex	Neu5PhAc
Konzentration-Bereich (mM)	1.0 ~ 15	0.02 ~ 10	0.05 ~ 8	0.1 ~ 30	1.0 ~ 40
Substrat	Neu5Bz	Neu5Ms			
Konzentration-Bereich (mM)	1.0 ~ 30	0.05 ~ 8.0			

Kinetik-Messung von CSS-Mutanten für Neu5Ac und seine Derivate

Mittels pH-Assay wird die Kinetik von 6 CSS-Mutanten, F192A, F193A, N175A, Q104A, R173A und D209A, für Neu5Ac und seine Derivate untersucht. In den Messungen bleibt die Konzentration von CTP unverändert bei 0.5 mM. Die Konzentration von Neu5Ac und seinen Derivaten für jeden CSS-Mutanten variiert. (Tabelle 14)

Tabelle 14: Die Konzentrationsbereiche der verschiedenen Substrate für die kinetische Messung der CSS-Mutanten

Konz. Bereich Von Substraten [mM]	F192A	F193A	N175A	R173A	Q104A	D209A
[Neu5Ac]	0.03 ~ 10	0.03 ~ 3	0.03 ~ 3	0.03 ~ 5	0.03 ~ 10	0.03 ~ 5
[Neu5Ac-9N ₃]	0.02 ~ 5	0.02 ~ 3	0.02 ~ 5	0.02 ~ 3	0.02 ~ 5	0.02 ~ 3
[C8-Neu5Ac]	0.1 ~ 5	0.1 ~ 3	0.1 ~ 2	0.1 ~ 3	0.1 ~ 5	0.1 ~ 2
[C7-Neu5Ac]	0.01 ~ 1	0.01 ~ 1	0.01 ~ 1.5	0.01 ~ 1	0.05 ~ 1	0.1 ~ 2
[KDN]	5 ~ 70	4 ~ 70	1 ~ 40	5 ~ 70	5 ~ 60	5 ~ 70
[epi-KDN]	0.5 ~ 8	1 ~ 10	1 ~ 10	0.5 ~ 10	1 ~ 8	1 ~ 8
[Neu5Gc]	0.02 ~ 10	0.02 ~ 10		0.08 ~ 8	0.02 ~ 10	
[Neu5Hex]	0.1 ~ 6	0.5 ~ 15	0.1 ~ 10	0.05 ~ 12	0.05 ~ 8	0.01 ~ 3
[Neu5Bz]	0.05 ~ 15	0.1 ~ 10	1 ~ 15	0.05 ~ 10	0.05 ~ 20	0.1 ~ 15
[Neu5Ms]	0.01 ~ 3	0.01 ~ 2	0.01 ~ 0.8	0.01 ~ 2	0.05 ~ 3	0.03 ~ 2

Die Reaktionsbedingungen sind ähnlich wie vorher. Die kinetische Daten K_M und k_{cat} werden ebenfalls durch die *Michaelis-Menten* Gleichung kalkuliert.

5.4.Synthesen

5.4.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Herstellung einer Ether-Bindung

In einer Suspension von 0.8 ~ 3.5 Äq. NaH (60%) im getrockneten THF (THF*) wird 1 Äquivalent des entsprechenden Alkohols bei 0 °C unter einer Schutzgasatmosphäre tropfenweise zugegeben. Das Reaktionssystem wird für 1 h gerührt, bis keine H₂-Entwicklung mehr zu beobachten ist. Anschließend wird die Lösung des entsprechenden Bromids (1 Äq.) in THF bei RT zugesetzt. Die Reaktionsmischung wird auf 63 °C erhitzt und über Nacht gerührt, bis kein weiterer Umsatz mehr zu beobachten ist. Die Reaktionsmischung wird mit THF verdünnt und mit ges. NaCl-Lösung dreimal gewaschen. Die organische Phase wird mit MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

AAV 2a: Substitution von Brom durch Azid an Carbonsäure

Einer Lösung von 1 Äq. Brom-Carbonsäure in DMSO oder DMF wird in eine Suspension von 2 ~ 5 Äq. NaN₃ (zerkleinert durch Mörser) in DMSO oder DMF tropfenweise gegeben. Diese Reaktionsmischung wird bei RT so lange Zeit gerührt, bis eine vollständige Umsetzung bei der DC-Kontrolle zu beobachten ist. Anschließend wird der pH-Wert der Reaktionsmischung nach der Zugabe von H₂O mit konz. HCl auf ca. 2 ~ 3 eingestellt. Danach wird die Mischung mit DCM oder EE fünf- bis sechsmal extrahiert. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung einmal gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Das Produkt wird im HV getrocknet.

AAV 2b: Substitution von Brom durch Azid an Carbonsäure

Die Suspension von 5 Äq. NaN₃ in DMF wird bei 65 °C für 30 min ~ 1 h gerührt. Anschließend wird eine Lösung von 1 Äq. Brom-Säure in DMF der Suspension zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 18 ~ 24 h gerührt, bis eine vollständige Umsetzung auf DC

beobachtet wird. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wird nach Zugabe von H₂O mit konz. HCl auf ca. 2 ~ 3 eingestellt. Dann wird mit EE fünf- bis sechsmal extrahiert. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung einmal gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt.

AAV 3a: β -Glycosylierung mit *Königs-Knorr*-Methode

Unter Lichtausschluss und Schutzgasatmosphäre werden Ag₂O, der entsprechende Alkohol, getrocknetes CHCl₃ und einige 4Å-Molsieb in einen Kolben gegeben und für 30 min bis 1 h bei RT gerührt. Anschließend wird eine Lösung von Glycosylbromid in trockenem CHCl₃ mit einer Spatelspitze Iod versetzt, und weiter für 27 – 72 h, bis zum vollständigen Umsatz oder bis kein weiterer Umsatz mehr zu beobachten ist, bei RT gerührt.

Dann wird die Reaktionsmischung über Kieselgur filtriert und je zweimal mit H₂O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt durch Säulen-Chromatographie mit Cy/EE (1:1 – 1:2) als Laufmittel aufgereinigt.

AAV 3b: β -Glycosylierung mittels *Lewis-Säure* BF₃-Et₂O

In einer Lösung von 1 Äq. peracetyliertes Lactosid, Galactosid, Glucosid oder GlcNAc in trockenem DCM (DCM*) werden 1.2 Äq. des entsprechenden Alkohols und 1.5 Äq. BF₃-Et₂O unter Schutzgasatmosphäre bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 5 h bis 12 h gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung oder keinem weiteren Umsatz wird K₂CO₃ der Mischung zugegeben und weiter für 30 min. bei RT gerührt. Im Anschluss wird die Mischung filtriert und das Filtrat zweimal mit H₂O gewaschen. Aus den vereinigten wässrigen Phasen wird das Produkt zweimal mit DCM zurück extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt.

AAV 3c: β -Glycosylierung nach dem *Trichloracetatimidat* Verfahren

Zu einer Lösung von 1 ~ 2 Äq. Gly-NHCCl₃ und 1 Äq. Alkohol in getrocknetem CH₂Cl₂ wird 4 Å Molekularsieb gegeben. Nach einstündigem Rühren bei RT unter Argon wird die Lösung im Dunkeln mit 0.3 ~ 1 Äq. AgOTf oder TMSOTf versetzt und weiter gerührt, bis keine weitere oder eine vollständige Umsetzung zu beobachten ist. Anschließend wird Et₃N zu der Mischung

gegeben. Zur Aufarbeitung wird das Rohprodukt mit CHCl_3 verdünnt, und über Kieselgur filtriert. Die Mutterlösung wird mit Wasser, ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie gereinigt.

AAV 3d: α -Glycosylierung durch die *Fischer*-Methode mit anschließender enzymatischer Reinigung

10 Äq. TMSCl werden in einer Suspension von 1 Äq. Glycopyranose in dem entsprechenden Alkohol (30 ~ 50 Äq) gegeben. Die Mischung wird bei RT für 24 bis 72 h gerührt, bis kein weiterer Umsatz auf dem DC angezeigt wird, und anschließend eingengt. Der Rückstand wird in H_2O gelöst und dann mit Et_2O zweimal gewaschen. Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt.

Die Fraktionen, die α -Produkt enthalten, werden gesammelt, eingengt und in Phosphat Puffer (1 mM, pH = 7.6) gelöst. Die Lösung wird mit dem Enzym, Glycosidase, versetzt, und bei 37 °C für 48 ~ 72 h gerührt, bis kein β -Glycosid im NMR-Spektrum nachzuweisen ist. Die Reaktionsmischung wird eingengt, und der Rückstand wird durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

AAV 4: Herstellung des Glycosylazids

Die Lösung von 1.3 Äq. NaN_3 in H_2O wird in eine Lösung von 1 Äq. Glycosylbromid in einer Aceton/Wasser-Mischung (4-facher Überschuss von H_2O) bei RT gegeben. Diese Mischung wird bei RT über Nacht gerührt, bis ein vollständiger Umsatz bei DC-Kontrolle angezeigt wird. Nach der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der Rückstand mit H_2O zweimal gewaschen und anschließend in EtOH umkristallisiert.

AAV 5a: Hydrierung des Azids

Die Hydrierung der Azido-Gruppe zur Amin-Gruppe Pd/C , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ oder Pd/CaCO_3 als heterogener Katalysator wird unter Argon-Schutzgasatmosphäre in einer Lösung vom entsprechenden Azid-Substrat in getrocknetem THF, MeOH, DMSO oder einer NH_4OH -Lösung (20 mM) durchgeführt. Der Kolben mit der schwarzen Suspension wird dann drei Mal mit H_2 gespült. Anschließend wird der Wasserstoff unter leichtem Überdruck, z.B. aus einem Ballon, kontinuierlich der Mischung zugeführt. Es wird über Nacht gerührt. Nach der vollständigen

Umsetzung wird die Reaktionsmischung durch Kieselgur abfiltriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhält man das saubere Amin.

AAV 5b: Hydrierung

Die Reaktionsmischung aus Azid-Substrat in Et₂O oder MeOH/H₂O (10/0.5) und PPh₃ (1~4 Äq.) wird bei RT für 4 h bis über Nacht gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in H₂O suspendiert und mit EE drei Mal gewaschen. Das saubere Produkt in der wässrigen Phase wird lyophilisiert.

AAV 6a: Herstellung der Amid-Bindung

Der Lösung von 1 Äq. Glycosamin in getrocknetem DCM (DCM*) werden 5.5 Äq. Pyridin und 0.05 Äq. DMAP unter Argon bei 0 °C zugegeben, anschließend wird mit 3.5 Äq. Anhydrid in DCM bei 0 °C unter Argon tropfenweise versetzt und weiter bei 0 °C gerührt. Nachdem keine weitere Umsetzung (ca. 2 ~ 46 h) zu beobachten ist, wird mit 1 N HCl gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Der Rückstand wird in einer Lösungsmittelmischung von EE und Cy auskristallisiert.

AAV 6b: *N*-Derivatisierung von D-Mannosamin

1 Äquivalent ManNH₂.HCl und 1 Äquivalent Et₃N werden in getrocknetem DMF unter Argon gerührt. Nach 30 min Rühren werden 1.2 ~ 1.5 Äquivalent der entsprechenden Carbonsäure in die Reaktionsmischung gegeben. Nachdem 1.1 Äquivalent 1-Hydroxy-benzotriazol (HOBt) in der Mischung unter Dunkelheit gegeben wurden, wird die Reaktionsmischung mit einem Eis-Bad auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden unter Argon 1.2 Äquivalent *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) bei 0 °C in die Mischung gegeben, die weiter 1-3 h bei 0°C und danach noch solange bei RT über Nacht gerührt wird, bis die DC-Kontrolle keinen weiteren Umsatz anzeigt.

Zur Aufarbeitung wird die Mischung über eine Fritte abgesaugt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand durch eine Flash-Kieselgelsäule aufgereinigt. Man erhält das gewünschte Produkt als ein Gemisch der beiden Anomere.

AAV 6c: *N*-Derivatisierung von D-Mannosamin

In einer Lösung von 1 Äq. $\text{ManNH}_2\cdot\text{HCl}$, 1.1 Äq. NaOMe in MeOH und 1 Äq. Et_3N werden 1.2 ~ 1.5 Äq. Carbonsäurederivat unter Argon als Schutzgas bei RT zugegeben. Nach 3 ~ 10 stündigem Rühren bei RT wird die Reaktionsmischung im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie aufgereinigt und das Produkt wird als ein Gemisch von der beiden anomeren Formen erhalten.

AAV 7: Entschüttung

NaOMe wird in die Lösung des acetylierten Substrats in MeOH zugegeben. Diese Mischung wird für 2 ~ 20 h bei RT gerührt. Nach Beenden der Reaktion wird wenig H^+ -Ionenaustauscher zu der Mischung gegeben und für einige Min. gerührt. Nach dem Abfiltrieren des Ionenaustauschers wird das Filtrat eingengt. Bei Bedarf wird das Produkt durch Kristallisation oder Chromatographie aufgereinigt.

AAV 8: Click-Reaktion

Die entsprechenden Azide (1 ~ 1.2 Äq.) werden je nach ihrer Polarität in Wasser, $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) oder Aceton gelöst. Gleichfalls werden die Alkine (1 Äq.) in den entsprechenden Lösungsmitteln gelöst und in die Azid-Lösung gegeben. Anschließend wird die Lösung von CuSO_4 (0.2 ~ 1 Äq.) in H_2O und die Lösung von Na-Ascorbat (0.2 ~ 1 Äq.) in H_2O nacheinander zu der Reaktionsmischung gegeben. Diese Mischung wird dann für 30 min bis über Nacht bei RT gerührt, bis ein vollständiger Umsatz bei der DC-Kontrolle zu beobachten ist. Anschließend wird die Mischung filtriert und eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt.

AAV 9: Enzymatische Synthese von Sialinsäuren

Die entsprechenden Man- oder ManNAc -Derivate (1 ~ 2 Äq.) werden im Phosphat-Puffer (100 mM, pH = 7.6) gelöst. Zu der Lösung werden Natriumpyruvat (1 ~ 3 Äq.) und NaN_3 -Lösung (Endkonzentration: 10 mM) zugegeben. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wird überprüft und bei Bedarf erneut mit 1 N NaOH auf pH 7.6 eingestellt. Anschließend wird die Aldolase zugesetzt. Diese Reaktionsmischung wird bei 37 °C und 160 rpm über Nacht geschüttelt.

Wenn die DC-Kontrolle keinen weiteren Umsatz anzeigt, wird EtOH (5-facher Überschuss des Reaktionsvolumens) zu der Reaktionsmischung gegeben und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für $3 \sim 5\text{ h}$ aufbewahrt, um das Enzym zu denaturieren. Ausgefallenes Protein und Phosphat werden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert. Der Überstand wird dann eingengt und chromatographisch über eine BioGel P-2-Säule aufgereinigt. Die Produktfraktionen werden gesammelt und eingengt. Wenn nötig, wird die wässrige Lösung des Produkts noch mal durch eine H^{+} -Ionenaustauscher-Säule gewaschen. Zum Schluss wird das Produkt lyophilisiert.

AAV 10: Enzymatische CMP-Aktivierung von Sialinsäuren

Sialinsäure (1 Äq.) und CTP ($1.1 \sim 1.5$ Äq.) werden in 50 mM Tris-Puffer ($\text{pH} = 8.5$) gelöst, der zusätzlich noch 50 mM MgCl_2 -Lösung enthält. Nach der Kontrolle und Einstellung des pH-Werts auf 8.5 mit 1 N NaOH wird das Enzym CMP-Sialat-Synthetase in die Reaktionsmischung gegeben. Anschließend wird diese Mischung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Während der Reaktion wird der pH-Wert ständig kontrolliert. Wenn eine vollständige oder keine weitere Umsetzung bei DC-Kontrolle zu beobachten ist, wird die Reaktionsmischung zentrifugiert. In den Überstand wird EtOH ($V_{\text{EtOH}} = 3 \times V_{\text{Puffer-Lösung}}$) zugegeben und diese Mischung wird bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 h aufbewahrt, um das Enzym zu denaturieren. Ausgefallenes Protein und Phosphat werden dann bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert. Der Überstand wird an einem Rotationsverdampfer eingengt und das Produkt dann lyophilisiert.

Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgt über eine BioGel P2-Säule ($2.5 \times 100\text{ cm}$) mit H_2O ($\text{pH} = 8.5 \sim 9.0$) als Elutionsmittel.

AAV 11: α 2,3-Sialytransfer

In eine Puffer-Lösung (Hepes: 20 mM; MgCl_2 : 10 mM, $\text{pH} = 7.5$) werden 1 Äq. Lactosid und entsprechende CMP-Neuraminsäure (insgesamt: $4 \sim 8$ Äq.) zugegeben. Anschließend wird der pH-Wert der Mischung kontrolliert und auf 7.5 eingestellt. Dann werden alkalische Phosphatase und α -2,3-Sialytransferase zugegeben. Die angegebenen Mengen an CMP-Sialinsäure werden jedoch nicht gleich zu Beginn der Reaktion komplett, sondern portionsweise zugesetzt. Die Reaktionsmischung wird bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt und mittels DC die Reaktion gefolgt.

Weil bei der Reaktion immer Phosphat entsteht, wird der pH-Wert der Reaktion ständig kontrolliert und durch Zugabe von 0.1 N NaOH bei 7.5 gehalten.

Wenn die DC-Kontrolle eine vollständige oder keine weitere Umsetzung zeigt, wird die Reaktionsmischung zentrifugiert. In dem Überstand wird EtOH ($V_{\text{EtOH}} = 3 \times V_{\text{Puffer-Lösung}}$) zugegeben und diese Mischung wird bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für $2 \sim 3\text{ h}$ aufbewahrt. Ausgefallenes Protein und Phosphat werden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert. Der Überstand wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

Das Rohprodukt wird dann durch Chromatographie entweder über BioGel P-2 mit H_2O als Elutionsmittel oder über RP-C18-Kieselgel mit einem Gradienten von $5 \sim 50\%$ MeOH (in H_2O) als Elutionsmittel aufgereinigt. Die Produktfraktionen werden eingengt und dann in wenig H_2O aufgenommen und lyophilisiert.

AAV 12: $\alpha 2,6$ -Sialytransfer

In eine Puffer-Lösung (Tris: 50 mM ; MgCl_2 : 20 mM , $\text{pH} = 8.5$) werden $1\text{ } \ddot{\text{A}}\text{q.}$ Lactosid und entsprechende CMP-Neuraminsäure (insgesamt: $4 \sim 8\text{ } \ddot{\text{A}}\text{q.}$) zugegeben. Der pH-Wert der Mischung wird kontrolliert auf 8.5 eingestellt. Anschließend werden alkalische Phosphatase und $\alpha 2,6$ -Sialyltransferase darin zugegeben. Die angegebenen Mengen an CMP-Sialinsäure werden zu Beginn der Reaktion nur $2\text{ } \ddot{\text{A}}\text{q.}$ zuerst zugesetzt, und während der Reaktion wird übrige frische CMP-Sia noch zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt und mittels DC der Reaktionverlauf verfolgt. Wie bei $\alpha 2,3$ -Sialyltransferreaktionen wird der pH-Wert der Reaktion ständig kontrolliert und durch Zugabe von 0.1 N NaOH bei 8.5 gehalten.

Wenn die DC-Kontrolle eine vollständige oder keine weitere Umsetzung zeigt, wird die Reaktionsmischung zentrifugiert. In den Überstand wird EtOH ($V_{\text{EtOH}} = \text{ca. } 3 \times V_{\text{Puffer-Lösung}}$) zugegeben und diese Mischung wird bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für $2 \sim 3\text{ h}$ aufbewahrt. Ausgefallenes Protein und Phosphat werden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert. Der Überstand wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

Das Rohprodukt wird dann durch Chromatographie entweder über BioGel P-2 mit H_2O als Elutionsmittel oder über RP-C18-Kieselgel mit einem Gradienten von $5 \sim 50\%$ MeOH (in H_2O) als Elutionsmittel aufgereinigt. Die Produktfraktionen werden eingengt und dann in wenig H_2O aufgenommen und lyophilisiert.

AAV 13: CMP-Aktivierung und Sialytransfer in der Kaskade

Neuraminsäure (4 ~ 8 Äq.) und CTP (4.8 ~ 9.5 Äq.) werden in der Puffer-Lösung (Tris: 50 mM, MgCl_2 : 50 mM, pH = 8.5) gelöst. Nach der Kontrolle und Einstellung des pH-Werts auf 8.5 mit 1 N NaOH wird das Enzym CMP-Sialat-Synthetase in die Reaktionsmischung gegeben. Anschließend wird diese Mischung bei 37 °C geschüttelt. Während der Reaktion wird der pH-Wert ständig kontrolliert. Nach der vollständigen Umsetzung wird die Reaktionsmischung zentrifugiert. Der Überstand wird zu einem Sialylakzeptor, Lactosid (1 Äq.), gegeben. Der pH-Wert wird wieder kontrolliert und auf pH 8.5 eingestellt. Anschließend werden alkalische Phosphatase und α -2,3/2,6-Sialytransferase der Mischung zugegeben. Die neue Reaktionsmischung wird bei 37 °C (für α -2,3SiaT) oder 30 °C (für α -2,6 SiaT) weiter geschüttelt, bis eine vollständige oder keine weitere Umsetzung auf DC beobachtet wird. Anschließend wird das bei der Reaktion entstehende Phosphat-Salz abzentrifugiert. Der Überstand wird im Vakuum eingengt und abhängig vom Produkt entweder über BioGel P-2 mit H_2O als Elutionsmittel oder über RP-C18-Kieselgel mit einem Gradienten von 5 ~ 50% MeOH (in H_2O) aufgereinigt. Die Produktfraktionen werden eingengt und dann in wenig H_2O aufgenommen und lyophilisiert.

AAV 14: Herstellung der fluoreszenzmarkierten Erythrozyten mittels Sialidase und α 2,3 SiaT

200 μL Heparin-Blutzellen werden zweimal mit Saline gewaschen. Anschließend wird eine Mischung aus 50 μL Saline, 22 μL Reaktionspuffer (50 mM Natrium-Citrat, pH = 6.0) und 0.6 μL (0.03 U) Sialidase zu den Erythrozyten gegeben. Als negative Kontrolle wird diese Mischung ohne Sialidase zu den Erythrozyten gegeben. Die beiden Proben werden bei 37 °C für 1h aufbewahrt.

Die Mischung wird bei 1500 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand von jeder Probe wird mittels TBA-Assay auf freigesetzte Sialinsäure geprüft.

Das Untermaß wird dann mit PBS-Lösung fünfmal gewaschen, um das Enzym Sialidase zu entfernen. In 100 μL gewaschener Blut-Lösung werden 150 μL (20 mM, pH = 7.6) Salin-Hepes-Puffer, 50 μL (50 mM) CMP-Neu5Ac-CoumNEt₂ und 80 μL α -2,3-SiaT zugegeben. Diese Mischung wird bei 37 °C aufbewahrt. Jeweils nach 1h, 2h, 3h, und 9h werden 10 μL Reaktionsmischung entnommen, mit Salin dreimal gewaschen, wieder in ca. 10 μL Salin-Lösung suspendiert und dann unter Fluoreszenz-Mikroskope untersucht.

TBA-Assay^[87, 319]:

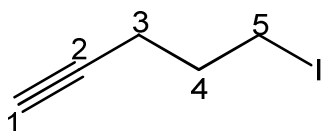
Die Überstände (100 μL von jeder Probe) werden mit 100 μL H_2O verdünnt, mit 50 μL Periodat-Lösung versetzt, dann bei 37 °C für 30 min aufbewahrt, anschließend mit 50 μL Asenit-Lösung und 100 μL TBA-Lösung versetzt, bei 100 °C für 7.5 min aufbewahrt. Nach Zugabe von 400 μL DMSO ist die Mischung der positive Probe lila verfärbt, während die negative Probe farblos bleibt. Diese Mischung wird dann bei einer Wellenlänge von 549 nm mittels Photometer gemessen.

5.4.2. Präparative Synthesen

5-Iodo-1-pentin (Pentin-I) (1)

Die Mischung aus 14.95 g (145.8 mmol, 1 Äq.) 5-Chlor-1-pentin und 65.6 g (437.4 mmol, 3 Äq.) NaI in 300 mL Aceton wird über Nacht bei Siedehitze unter Rückfluss gerührt. Anschließend wird die Mischung abgekühlt und eingengt. Der Rückstand wird mit 150 mL H₂O versetzt und mit Et₂O (3 x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Produkt wird bei 45 °C destilliert.

Ausbeute: 22.14 g (78%), als farblose Flüssigkeit



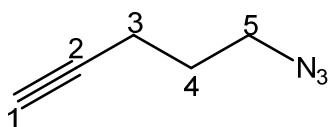
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 3.25 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, 5-H), 2.29 – 2.26 (m, 2H, 3-H), 1.97 – 1.90 (m, 3H, 1-, 4-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 82.65 (C-2), 69.86 (C-1), 32.24 (C-4), 19.86 (C-3), 5.43 (C-5) ppm.

5-Azido-1-pentin (Pentin-N₃) (2)

Zu 2.045 g (31.5 mmol, 3 Äq.) NaN₃ wird eine eisgekühlte Lösung von 2.035 g (10.5 mmol, 1 Äq.) 5-Iodpentin (1) in trockenem DMF (9.2 mL) gegeben. Die Mischung wird über Nacht gerührt. Anschließend wird aus der Reaktionsmischung nach der Zugabe von 46 mL H₂O mit Et₂O (6 x 23 mL) das Produkt extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: 0.891 g (78%), als farblose Flüssigkeit



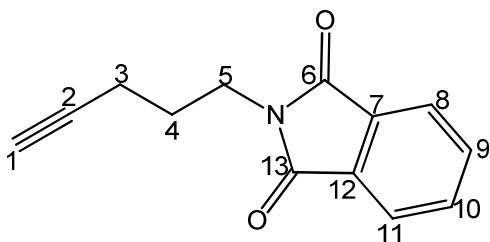
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 3.44 – 3.35 (m, 2H, 5-H), 2.30 (td, J = 6.9, 2.7 Hz, 2H, 3-H), 1.98 (t, J = 2.7 Hz, 1H, 1-H), 1.79 (p, J = 6.8 Hz, 2H, 4-H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 82.59 (C-2), 69.32 (C-1), 50.02 (C-5), 27.63 (C-3), 15.69 (C-4) ppm.

5-*N*-phthaliamid-1-pentin (Pentin-Pht) (3)

In eine Lösung von 1.513 g (7.80 mmol, 1 Äq.) 5-Iodo-1-pentin in trockenem DMF (15 mL) werden 2.323 g (12.50 mmol, 1.6 Äq.) Kalium-Phthalamid zugegeben. Die Mischung wird auf 70 °C erhitzt und weiter über Nacht gerührt. Nach Abkühlen und Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand in DCM suspendiert und über Flash-Kieselgel abgesaugt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 1.63 g (98%), als farbloser Feststoff



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.81 (dd, J = 5.3, 3.2 Hz, 2H, 8-, 11-H), 7.69 (dd, J = 6.9, 4.3 Hz, 2H, 9-, 10-H), 3.90 – 3.65 (m, 2H, 5-H), 2.24 (td, J = 7.1, 2.6 Hz, 2H, 3-H), 2.01 – 1.71 (m, 3H, 4-, 1-H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 168.30 (C-6, -13), 133.91 (C-8, -11), 132.09 (C-7, -12), 123.19 (C-9, -10), 82.95 (C-2), 68.97 (C-1), 37.12 (C-5), 27.25 (C-3), 16.24 (C-4) ppm.

5-Amino-1-pentin (Pentin-NH₂) (4)

Ansatz I

Nach der Zugabe von 1.805 g (6.88 g, 1.5 Äq.) PPh₃ in eine Lösung von 500 mg (4.587 mmol, 1 Äq.) Pentin-N₃ (2) in absolutem Et₂O (3 mL) unter einer Argonschutzgasatmosphäre bei 0 °C wird diese Mischung bei 0 °C für 3 h gerührt. Anschließend wird mit 0.4 mL H₂O versetzt und weiter über Nacht gerührt. Danach werden 10 mL 10%-ige HCl-Lösung in die Reaktionsmischung gegeben und mit Et₂O (3 x 30 mL) gewaschen. Der pH-Wert der wässrigen Phase wird mit 2 N NaOH-Lösung auf pH 10 eingestellt und dann mit Et₂O (8 x 35 mL) solange extrahiert, bis kein Produkt mehr in der wässrigen Phase vorhanden ist. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt.

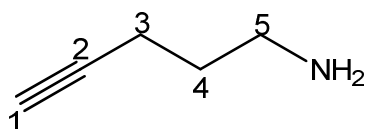
Ausbeute: 154 mg (40%), als hellgelbe Flüssigkeit

Ansatz II

0.782 mL (16.4 mmol, 3.5 Äq.) NH₂NH₂·H₂O werden zu einer Suspension von 1.0 g (4.69 mmol, 1 Äq.) Pentin-Pht (3) in 30 mL EtOH gegeben. Die Mischung wird auf 78 °C erhitzt und unter Rückfluss gerührt. Nach ca. 1 h wird die Reaktionsmischung abgekühlt und eingengt. Der Rückstand wird in H₂O aufgenommen und mit Et₂O und EE extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, eingengt und das Produkt anschließend destilliert.

Ausbeute: 77 mg (20%), als hellgelbe Flüssigkeit

$R_f = 0.15$ (C/M, 2:1)



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.77 (t, J = 6.9 Hz, 2H, 5-H), 2.22 (td, J = 7.0, 2.6 Hz, 2H, 3-H), 1.92 (t, J = 2.7 Hz, 1H, 1-H), 1.62 (p, J = 7.0 Hz, 2H, 4-H) ppm.

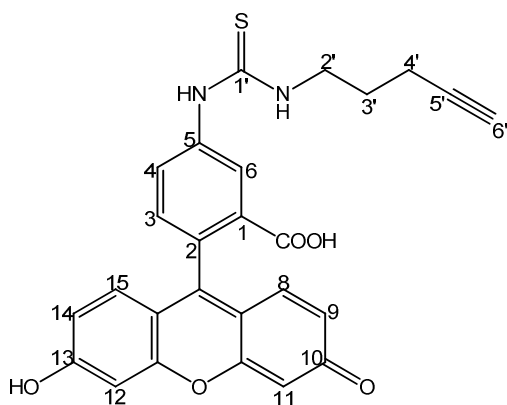
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 83.94 (C-2), 68.49 (C-1), 41.02 (C-5), 32.09 (C-3), 15.80 (C-4) ppm.

2-(6-Hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-5-(3-(pent-4-yn-1-yl)-thioureido)-benzoesäure (FITC-Pentin) (5)

Eine Lösung von 40 mg (0.103 mmol, 1 Äq.) FITC und 13 mg (0.154 mmol, 1.5 Äq.) Pentin-NH₂ (4) in 1 mL DMSO* (wasserfrei) wird bei RT über Nacht gerührt bis eine vollständige Umsetzung beobachtet wird. Anschließend wird die Reaktionsmischung im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit C/M (5:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 44 mg (91%), als gelboranger Feststoff

R_f = 0.23 (C/M, 5:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.03 (d, J = 1.7 Hz, 1H, 6-H), 7.63 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 4-H), 7.04 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 3-H), 6.61 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 8-, 15-H), 6.57 (d, J = 2.4 Hz, 2H, 11-, 12-H), 6.44 (dd, J = 2.5, 8.8 Hz, 2H, 9-, 14-H), 3.60 (t, 2H, 2'-H), 2.18 – 2.17 (m, 3H, 4'-, 6'-H), 1.78 – 1.75 (m, 2H, 3'-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 176.60 (C-10), 171.74 (C-1'), 162.50 (COOH), 154.94 (C-13), 142.5 (C-19), 130.92 (C-8, -15, -4), 126.44 (C-3), 121.0 (C-6), 114.63 (C-9, -14), 112.28 (C-2, -7), 103.99 (C-11, -12), 84.65 (C-5'), 70.62 (C-6'), 45.08 (C-2'), 29.36 (C-3'), 17.15 (C-4') ppm.

ESI-MS: $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S}$ [$\text{M} + \text{Na}$]⁺, berechnet 473.5, gemessen 473.2;

$\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_5\text{S} [\text{M} + \text{H}]^+$, berechnet 495.5, gemessen 495.2;

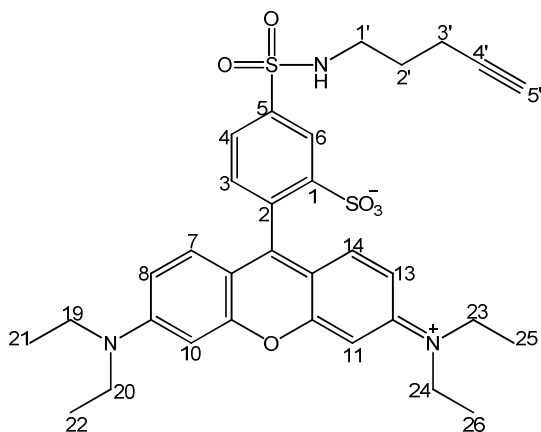
$\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{S} [\text{M} - \text{H}]^+$, berechnet 471.5, gemessen 471.0.

2-(6, 3-(Diethylamino)-3*H*-xanthen-9-yl)-5-(*N*-(pent-4-yn-1-yl)-sulfamoyl)-benzene-sulfonat (Rho-Pentin) (6)

In eine Suspension von 108 mg (0.187 mmol, 1 Äq.) Lissamin-Rhodamin-B-sulfonylchlorid in 25 mL THF (wasserfrei) werden 125 mg (1.506 mmol, 8 Äq.) Pentin-NH₂ (4) und 52.8 µL Et₃N unter Argon bei RT zugegeben. Diese Reaktionsmischung wird bei RT für 3 h gerührt und anschließend bei – 20 °C über Nacht aufbewahrt. Nach der Zugabe von 1.5 mL NaOH-Lösung (1 N) und 10 mL EtOH wird die Reaktionsmischung filtriert und eingengt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie mit C/M/W (50:10:1) als LM aufgereinigt.

Ausbeute: 103 mg (88%), als dunkelroter Feststoff

$R_f = 0.46; 0.55$ (C/M/W, 50:10:1)



¹H NMR (500 MHz, DMSO): $\delta = 8.38$ (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 6-H), 7.96 (dt, $J = 1.8, 6.9$ Hz, 1H, 3-H), 7.60 (dd, $J = 1.1, 6.9$ Hz, 1H, 2-H), 7.47 (dd, 1H, 7-H), $7.17 - 7.14$ (m, 1H, 10-H), $7.07 - 7.04$ (m, 1H, 8-H), $6.99 - 6.95$ (m, 2H, 13-, 14-H), 6.90 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, 11-H), $3.66 - 3.59$ (m, 4H, 23-, 24-H), 2.95 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, 1'-H), 2.69 (d, $J = 1.0$ Hz, 2H, 5'-H), 2.16 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H, 3'-H), $1.61 - 1.58$ (m, 2H, 2'-H), $1.22 - 1.17$ (m, 12H, 21-, 22-, 25-, 26-H) ppm.

ESI-MS: $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{Na}_1\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, berechnet 646.2, gemessen 646.3;

$\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, berechnet 624.2, gemessen 624.3;

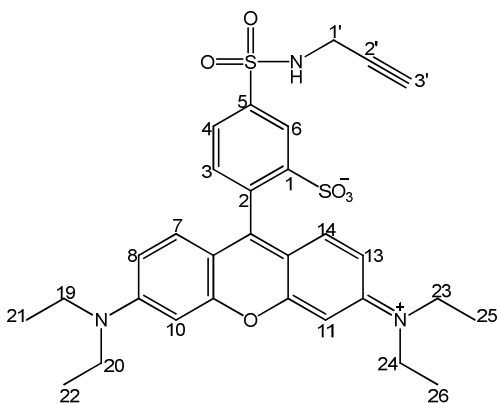
$\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^+$, berechnet 622.2, gemessen 622.3

**2-(6, 3-(Diethylamino)-3*H*-xanthen-9-yl)-5-(*N*-(propargyl)-sulfamoyl)-benzenesulfonat
(Rho-Prop) (7)**

In eine Lösung von 20 mg (0.035 mmol, 1 Äq.) Lissamin-Rhodamin-B-sulfonylchlorid in 2 mL DMF (wasserfrei) werden 3.6 μL (0.052 mmol, 1.5 Äq.) Propargylamin, 7.2 μL Et_3N und DMAP in katalytischer Menge unter Argon bei RT zugegeben. Diese Reaktionsmischung wird bei RT über Nacht gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand durch Säulenchromatographie mit C/M/W (50:10:1) als LM aufgereinigt.

Ausbeute: 10 mg (48%), als dunkelroter Feststoff

$R_f = 0.42; 0.53$ (C/M/W, 50:10:1)



ESI-MS: $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{NaO}_6\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, berechnet 618.7, gemessen 618.3;

$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, berechnet 596.7, gemessen 596.3;

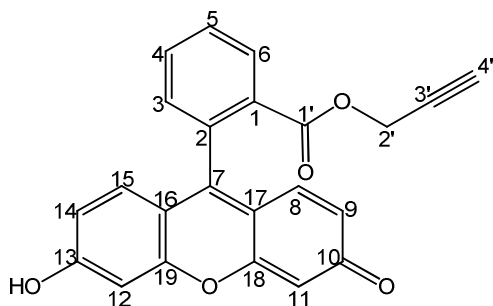
$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^+$, berechnet 594.7, gemessen 594.2.

Prop-2-yn-1-yl-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoat (Fl-Prop-Ester) (8)

Nach der Zugabe von 0.5 mL konz. H_2SO_4 in eine Suspension von 100 mg (0.301 mmol, 1 Äq.) Fluorescein in 2 mL (3.439 mmol, 11 Äq.) Propargylalkohol wird diese Mischung auf 120 °C erhitzt. Nach ca. 3-stündigem Rühren wird die Reaktionsmischung mit EE versetzt, filtriert und am Rotationsverdampfer eingedunstet. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie mit EE/MeOH (80:1) als LM aufgereinigt.

Ausbeute: 42 mg (38%), als hellbrauner Feststoff

$R_f = 0.19$ (EE/MeOH, 80:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 7.98$ (dd, $J = 7.9, 1.2$ Hz, 1H, 6-H), 7.76 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H, 4-H), 7.69 (td, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H, 5-H), 7.35 (dd, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1H, 3-H), 6.92 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, 8-, 14-H), 6.66 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H, 12-, 11-H), 6.60 (dd, $J = 9.2, 2.2$ Hz, 2H, 9-, 15-H), 4.49 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, 2'-H), 2.65 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, 4'-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 164.18$ (C-1'), 157.49 (C-13), 154.98 (C-19), 133.80 (C-2, -7), 132.62, 130.58, 130.28, 130.08, 129.63 (C_{ar}), 114.92 (C-14), 102.63 (C-11, -12), 75.92 (C-3'), 74.88 (C-4'), 51.92 (C-2') ppm.

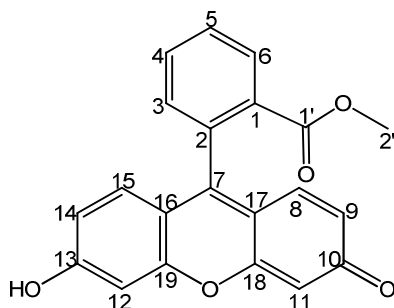
Methyl-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoat (Fl-Me-Ester) (9)

zu einer Suspension von 3 g (9.03 mmol) Fluorescein in 10 mL MeOH (wasserfrei) werden 2.25 mL konz. H_2SO_4 unter Argon tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird auf 80 °C erhitzt und über Nacht unter Rückfluss gerührt. Nach einer vollständigen Umsetzung werden 20 mL MeOH und ca. 4 g Eis zu der Reaktionsmischung gegeben, die anschließend durch

langsame Zugabe von 9 g NaHCO₃ bei 0 °C neutralisiert wird. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird diese Suspension abgesaugt und das Filtrat mit H₂O gewaschen. Der erhaltene hellbraune Feststoff wird wieder in 60 mL 2%-iger NaHCO₃-Lösung suspendiert, abgesaugt und mit H₂O gewaschen. Dieser Prozess wird viermal wiederholt. Danach wird der Feststoff noch mal in 1%-iger AcOH suspendiert, abgesaugt und mit H₂O gewaschen. Der erhaltene hellgelbe Feststoff wird im HV bei 110 °C getrocknet.

Ausbeute: 2.8 g (91%), als hellbrauner Feststoff.

$R_f = 0.65$ (C/M, 5:1)



¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 8.19 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 6-H), 7.86 (t, J = 7.4 Hz, 1H, 4-H), 7.77 (t, J = 7.7 Hz, 1H, 5-H), 7.48 (d, J = 7.4 Hz, 1H, 3-H), 6.79 (d, J = 9.1 Hz, 2H, 8-, 12-H), 6.57 – 6.54 (m, 4H, 9-, 14-, 11-, 15-H), 3.58 (s, 3H, 2'-H) ppm.

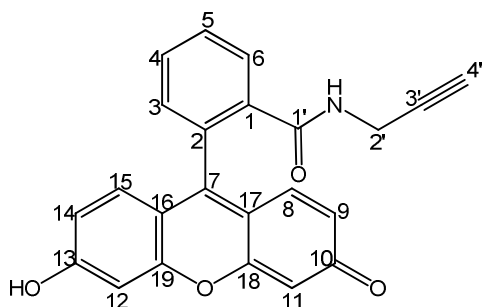
¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ = 165.33 (C-1'), 156.11 (C-13), 150.64 (C-18, -19), 134.11 (C-2, -7), 133.20 (C-4, -3, -8), 130.78 (C-6, -1, -14), 130.05 (C-15, -5, -9), 129.67 (C-17), 114.75 (C-16), 103.39 (C-12, -11), 52.37 (C-2') ppm.

2-(6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-N-(prop-2-yn-1-yl)-benzamid (10)

Eine Lösung von 1.45 mL (2.9 mmol, 2 Äq.) 2 M AlMe₃ in Toluol wird tropfenweise in eine Lösung von 398 μ L (5.8 mmol, 4 Äq.) Propargylamin in DCM bei 3 ~ 10 °C unter Argon als Schutzgas zugegeben. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird eine Lösung von 500 mg (1.45 mmol, 1 Äq.) Fl-Me-Ester (9) in 2 mL DCM bei RT zugegeben. Diese Mischung wird bei Sieden unter Rückfluss über Nacht gerührt. Nach dem Abkühlen werden 50 mL MeOH und 35 mL HCl (1 N) der Mischung zugegeben und für 1 h gerührt. Nach der Entfernung des

Lösungsmittels wird der Rückstand säulenchromatographisch mit C/M (8:1) als LM aufgereinigt.

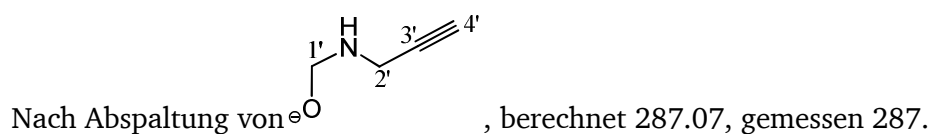
Ausbeute: 276 mg (52%), als gelboranger Feststoff.



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.98 (d, J = 6.7 Hz, 1H, 6-H), 7.56 - 7.54 (m, 2H, 5-, 14-H), 7.04 (d, J = 7.1 Hz, 1H, 15-H), 6.65 (d, J = 2.3 Hz, 2H, 8-, 12-H), 6.48 – 6.42 (m, 4H, 9-, 11, 4-, 3-H), 3.89 (d, J = 2.5 Hz, 2'-H), 3.60 (t, J = 2.5 Hz, 2H, 4'-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 168.91 (C-1'), 159.78 (C-13, -18), 154.49 (C-19), 153.91 (C-2, -7), 134.19 (C-5), 130.62 (C-17), 129.85 (C-4, -3), 129.46 (C-14), 124.50 (C-15), 123.52 (C-6), 112.85 (C-9, -11), 109.81 (C-16), 103.21 (C-8, -12), 77.95 (C-3'), 71.72 (C-4'), 28.96 (C-2') ppm.

EI-MS: $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{NO}_4$, berechnet 369.10, gemessen 369;

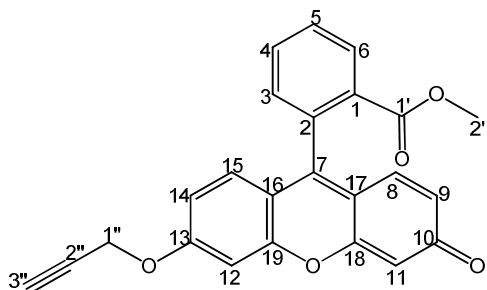


Methyl-2-(3-oxo-6-(prop-2-yn-1-yloxy)-3H-xanthen-9-yl)-benzoat (11)

Nach der Zugabe von 0.12 mL (0.64 mmol, 1.1 Äq.) Diethylazodicarboxylat in eine Suspension aus 200 mg (0.58 mmol, 1 Äq.) Fl-Me-Ester (9), Ph_3P und Propargylalkohol in 5 mL $\text{CH}_3\text{CN}/\text{THF}$ (1:1) wird die Reaktionsmischung bei RT für 2 h bzw. bis keine weitere Umsetzung auf der DC zu beobachten ist, gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand säulenchromatographisch mit EE/MeOH (80:1) als LM aufgereinigt.

Ausbeute: 163 mg (73%), als hellbrauner Feststoff.

$R_f = 0.32$ (EE/MeOH, 80:1)



^1H NMR (500 MHz, DMSO): $\delta = 8.18$ (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 6-H), 7.70 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, 4-H), 7.63 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, 5-H), 7.26 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 3-H), 7.03 (s, 1H, 12-H), 6.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 15-H), 6.77 (m, 2H, 8-, 14-H), 6.41 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 9-H), 6.31 (s, 1H, 11-H), 4.76 (s, 2H, 1'-H), 3.58 (s, 3H, 2'-H), 2.73 (s, 1H, 3''-H) ppm.

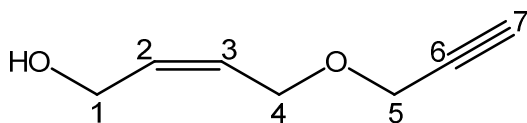
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): $\delta = 186.95$ (C-10), 167.01 (C-1'), 163.36 (C-13), 160.45 (C-18), 155.42 (C-19), 151.91 (C-2), 135.90 (C-7), 134.40 (C-4), 132.67 (C-6), 132.07 (C-3), 131.92 (C-8), 131.62 (C-1), 131.36 (C-9), 131.31 (C-5), 130.55 (C-15), 119.22 (C-17), 116.87 (C-16), 115.26 (C-14), 107.06 (C-11), 103.17 (C-12), 78.88 (C-2'), 78.84 (C-3'), 57.98 (C-1'), 53.89 (C-2') ppm.

(Z)-Hex-2-en-5-yn-1-ol (12)

4 g (0.167 mol, 1 Äq.) NaH werden in trockenen THF (150 mL) unter Argon bei 0 °C suspendiert. Anschließend gibt man unter starkem Rühren bei 0 °C 27.4 mL (0.333 mol, 2 Äq.) Butendiol dazu. Nach Beendigung der Gasentwicklung werden 28.7 mL (0.334 mol, 2 Äq.) Propargylbromid unter starkem Rühren tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend eingeeengt. Den gelben Rückstand verdünnt man mit gesättigter NaCl-Lösung (30 mL), extrahiert mit Diethylether (3 x 50 mL) und trocknet über Na_2SO_4 . Die vereinigten organischen Phasen werden eingeeengt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Cy/EE, 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 13.8 g (33% bezogen auf Butendiol), als hellgelbes Öl

$R_f = 0.30$ (Cy /EE, 1:1)



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.80$ (m, 1H, 2-H), 5.62 (m, 1H, 3-H), 4.16 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, 1-H), 4.10 (m, 4H, 4-H, 5-H), 2.75 (s, 1H, O-H), 2.45 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, 7-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): $\delta = 133.3$ (C-2), 127.2 (C-3), 79.5 (C-6), 74.9 (C-7), 65.0 (C-1), 58.5 (C-5), 57.3 (C-4) ppm.

2-(Benzyloxy)-essigsäure (13)

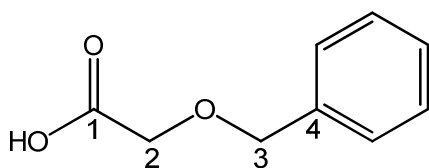
Ansatz nach AAV 1

Bromessigsäure: 8.55 g (60.71 mmol, 1 Äq.) in 170 mL THF*

Phenylmethanol: 10 mL (96.62 mmol, 1.6 Äq.) in 42.7 mL THF*

NaH (60%): 8.55 g (213.75 mmol, 3.5 Äq.) in 300 mL THF*

Ausbeute: 6.59 g (65%), als hellgelbe Flüssigkeit



$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.40 - 7.36$ (m, 5H, H_{ar}), 4.67 (s, 2H, 2-H), 4.17 (s, 2H, 3-H) ppm.

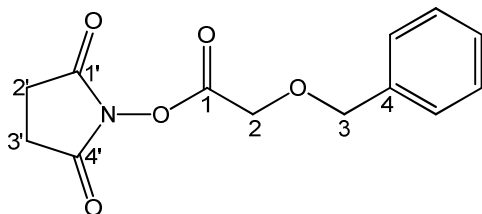
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 174.76$ (C-1), 136.67 (C-4), 128.53 (C_{ar}), 128.24 (C_{ar}), 128.16 (C_{ar}), 73.45 (C-2), 66.58 (C-3) ppm.

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-(benzyloxy)-acetat (14)

6.15 g (30 mmol, 1 Äq.) DCC und 4.05 g (30 mmol, 1 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid werden bei 0 °C in die Lösung von 5 g (30 mmol, 1 Äq.) Säure (**13**) in 120 mL THF* (wasserfrei) gegeben. Diese Mischung wird bei 0 °C für 2 h gerührt und weiter bei 2 ~ 4 °C über Nacht gerührt und anschließend abgesaugt. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt.

Ausbeute: 7.26 g (92%), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.44$ (Cy/EE, 1:1)



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.26 - 7.24$ (m, 5H, H_{ar}), 4.61 (s, 2H, 2-H), 4.36 (s, 2H, 3-H), 2.77 – 2.76 (m, 4H, 2', 3'-H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.37$ (C-1', -4'), 168.45 (C-1), 138.88 (C-4), 131.18 (C_{ar}), 130.89 (C_{ar}), 130.80 (C_{ar}), 76.21 (C-2), 67.46 (C-3), 28.15 (C-2', -3') ppm.

4-(Benzyloxy)-butan-1-ol (15)

Ansatz nach AAV 1

Benzylbromid: 9 mL (75.9 mmol, 1 Äq.)

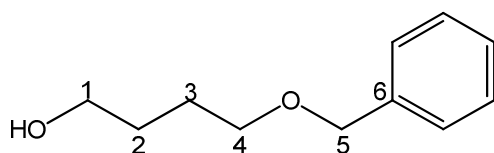
1,4-Butandiol: 13.1 mL (151.5 mmol, 2 Äq.)

NaH (60%): 3.11 g (77.7 mmol, 1 Äq.)

THF (wasserfrei): 300 mL

Ausbeute: 12.7 g (93%), als hellgelbe Flüssigkeit

$R_f = 0.45$ (Cy/EE, 1:2)



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.34 – 7.29 (m, 5H, H_{ar}), 4.51 (s, 2H, 5-H), 3.65 – 3.60 (m, 2H, 1-H), 3.52 – 3.49 (m, 2H, 4-H), 1.76 – 1.61 (m, 4H, 2-, 3-H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 138.18 (C-6), 128.42 (C_{ar}), 127.71 (C_{ar}), 127.66 (C_{ar}), 73.05 (C-5), 70.34 (C-4), 62.65 (C-1), 30.09 (C-2), 26.65 (C-3) ppm.

2-(4-(Benzyloxy)-butoxy)-essigsäure (16)

Ansatz nach AAV 1

Bromessigsäure: 7.0 g (50 mmol, 1.5 Äq.)

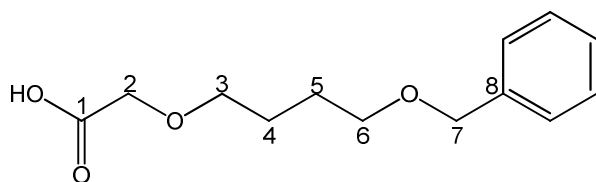
Alkohol (15): 6.0 g (33 mmol, 1 Äq.)

NaH (60%): 5.33 g (133 mmol, 4 Äq.)

Toluol (wasserfrei): 40 mL

Ausbeute: 4.81 g (62%), als hellgelbe Flüssigkeit.

R_f = 0.15 (Cy/EE, 1:2)



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 9.30 (s_{br} , 1H, OH), 7.26 – 7.23 (m, 5H, H_{ar}), 4.43 (s, 2H, 7-H), 4.01 (s, 2H, 2-H), 3.50 – 3.41 (m, 4H, 3-, 6-H), 3.50 (t, J = 6.0, 2H, 3-H), 1.67 - 1.56 (m, 4H, 5-, 4-H) ppm.

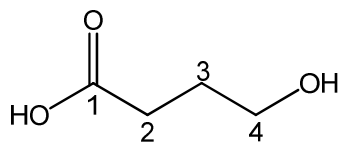
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 173.74 (C-1), 137.36 (C-8), 127.09 (C_{ar}), 126.70 (C_{ar}), 71.82 (C-7), 70.68 (C-2), 68.87 (C-6), 66.81 (C-3), 25.28 (C-5), 25.22 (C-4) ppm.

4-Hydroxybutansäure (17)

1.57 g (18.24 mmol, 1 Äq.) γ -Butyrolacton in 4 mL MeOH werden zu der Lösung von 1.5 g (26.95 mmol, 1.5 Äq.) KOH-Plätzchen in 7.8 mL MeOH tropfenweise gegeben. Die Mischung wird über Nacht bei RT gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung wird die Reaktionsmischung über H^+ -Ionenaustauscher entsalzt, filtriert und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 1.7 g (89%), als farblose Flüssigkeit

$R_f = 0.10$ (Cy/EE, 2:1)



1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 4.85$ (s, 1H, OH), 3.49 (t, $J = 6.0$, 2H, 4-H), 2.18 (t, $J = 6.0$, 2H, 2-H), 1.94 (m, 2H, 3-H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 181.9$ (C-1), 63.1 (C-4), 35.4 (C-2), 30.1 (C-3) ppm.

4-(Benzyloxy)-butansäure (18)

Ansatz I

Frisch zerkleinerte KOH-Plätzchen werden in eine Mischung von Benzylbromid (20 mL) und γ -Butyrolacton (3.19 mL, 41.8 mmol) in 75 mL Toluol gegeben. Die Mischung wird auf 95 °C erhitzt und über Nacht gerührt, nach dem Abkühlen mit 75 mL H_2O verdünnt, und das Produkt mit Et_2O (3 x 40 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und eingengt. Der verbliebene Toluol-Lösung wird mit NaOH-Lösung (5 M) versetzt, und bei 66 °C über Nacht kräftig gerührt. Diese organische Phase wird von der wässrigen Phase getrennt und einmal mit 50 mL H_2O gewaschen. Der pH-Wert der vereinigten wässrigen Phase wird mit konz. H_2SO_4 auf ca. 4 eingestellt, dann wird mit Et_2O (2 x 30 mL) und DCM (4 x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und eingengt.

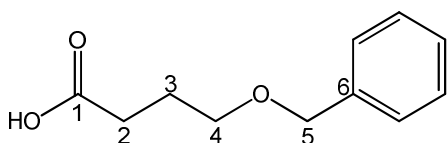
Ausbeute: 5.3 g (66%), als farblose ölige Flüssigkeit

Ansatz II

6.26 (16.63 mmol, 3 Äq.) Pyridiniumdichromat (PDC) wird bei 0 °C einer Lösung von 1 g (5.54 mmol, 1 Äq.) Alkohol (**15**) in 15 mL THF zugegeben. Diese Mischung wird bei RT über Nacht gerührt und anschließend mit 15 mL H₂O verdünnt. Nach dem Abkühlen wird mit Et₂O (2 x 30 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung (1 x 50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt.

Ausbeute: 0.77 g (72%), als farblose ölige Flüssigkeit

$R_f = 0.48$ (Cy/EE, 1:1)



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.33 – 7.29 (m, 5H, H_{ar}), 4.50 (s, 2H, 5-H), 3.52 (t, J = 6.0, 2H, 4-H), 2.47 (t, J = 6.0, 2H, 2-H), 1.94 (quint, J = 6.0, 2H, 3-H) ppm.

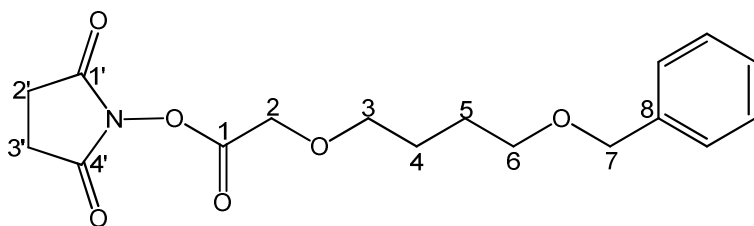
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 179.61 (C-1), 138.25 (C-6), 128.39 (C_{ar}), 128.16 (C_{ar}), 72.92 (C-5), 69.02 (C-4), 30.96 (C-2), 24.78 (C-3) ppm.

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 2-(4-(benzyloxy)butoxy)acetat (**19**)

1.751 g (8.40 mmol, 1 Äq.) DCC und 0.97 g (8.40 mmol, 1 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid werden bei 0 °C einer Lösung von 2 g (8.40 mmol, 1 Äq.) Säure (**16**) in 36 mL THF (wasserfrei) zugegeben. Diese Mischung wird bei 0 °C für 2 h gerührt und weiter bei 2 ~ 4 °C über Nacht gerührt und anschließend abgesaugt. Die Mutterlösung wird am Rotationsverdampfer eingengt.

Ausbeute: 2.75 g (98%), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.49$ (Cy/EE, 1:1)



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.34 - 7.28$ (m, 5H, H_{ar}), 4.49 (s, 2H, 7-H), 4.40 (s, 2H, 2-H), 3.62 (t, $J = 6.0$, 2H, 6-H), 3.50 (t, $J = 6.0$, 2H, 3-H), 2.82 – 2.78 (m, 4H, 2', 3'-H), 1.73 - 1.71 (m, 4H, 5-, 4-H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 168.78$ (C-1', -4'), 166.05 (C-1), 138.61 (C-8), 128.34 (C_{ar}), 127.61 (C_{ar}), 127.48 (C_{ar}), 72.83 (C-7), 72.11 (C-6), 69.87 (C-2), 66.07 (C-3), 26.27 (C-5), 26.17 (C-4), 25.56 (C-2', -3') ppm.

2-Azido-essigsäure (20)

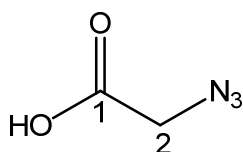
Ansatz nach AAV 2a

Bromessigsäure: 5.002 g (36 mmol, 1 Äq.) in 50 mL DMSO

NaN_3 : 4.931 g (75.9 mmol, 2 Äq.) in 175 mL DMSO

Ausbeute: 3.35 g (92%), als hellgelbe ölige Flüssigkeit

$R_f = 0.46$ (C/M, 5:1)



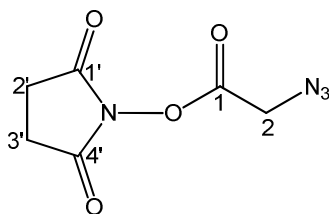
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 11.35$ (s, 1H, OH), 2.71 (s, 2H, 2-H) ppm.

^1H NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 173.04 (C-1), 50.08 (C-2) ppm.

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 2-azidoacetat (21)

4.125 g (19.79 mmol, 1 Äq.) DCC und 2.285 g (19.79 mmol, 1 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid werden bei 0 °C einer Lösung von 2 g (19.79 mmol, 1 Äq.) Azidoessigsäure (**20**) in 36 mL THF (wasserfrei) zugegeben. Diese Mischung wird bei 0 °C für 2 h gerührt und weiter bei 2 ~ 4 °C über Nacht gerührt und anschließend abgesaugt. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt.

Ausbeute: 3.65 g (93%), als hellgelber Feststoff



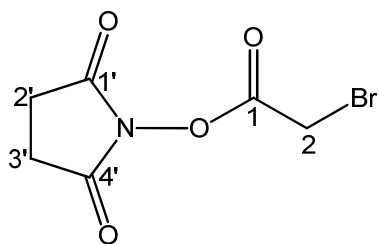
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 2.68 (s, 4H, 2'-, 3'-H), 2.49 (s, 2H, 2-H) ppm.

^1H NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 172.68 (C-1), 169.13 (C-1', -4'), 49.14 (C-2), 25.57 (C-2', 3') ppm.

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 2-bromoacetat (22)

4.455 g (21.6 mmol, 1 Äq.) DCC und 2.485 g (21.6 mmol, 1 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid werden bei 0 °C einer Lösung von 3 g (21.6 mmol, 1 Äq.) Bromessigsäure in 85 mL THF (wasserfrei) zugegeben. Diese Mischung wird bei 0 °C für 2 h gerührt und weiter bei 2 ~ 4 °C über Nacht gerührt und anschließend abgesaugt. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt.

Ausbeute: 4.89 g (96%), als hellgelber Feststoff



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 4.04 (s, 2H, 2-H), 2.79 (s, 4H, 2'-, 3'-H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 168.84 (C-1', -4'), 163.37 (C-1), 25.96 (C-2', 3'), 21.56 (C-2) ppm.

5-Azido-pentansäure (23)

Ansatz nach AAV 2a

Brompentansäure: 2 g (11.05 mmol, 1 Äq.)

NaN_3 : 3.59 g (55.24 mmol, 5 Äq.) in 65 mL DMSO

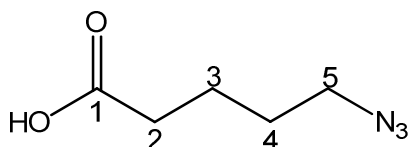
Ausbeute: 1.431 g (78%), als hellgelbe ölige Flüssigkeit

Ansatz nach AAV 2b

Brompentansäure: 10 g (55.3 mmol, 1 Äq.) in 20 mL DMF

NaN_3 : 17.95 g (276 mmol, 5 Äq.) in 300 mL DMF

Ausbeute: 5.42 g (59%), als hellgelbe ölige Flüssigkeit



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 10.42 (s, 1H, OH), 3.38 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 2-H), 2.37 (t, J = 7.2 Hz, 2H, 5-H), 1.78 – 1.56 (m, 4H, 3-, 4-H) ppm.

^1H NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 178.96 (C-1), 51.01 (C-5), 33.36 (C-2), 28.18 (C-4), 21.82 (C-3) ppm.

6-Azido-hexansäure (24)

Ansatz nach AAV 2a

Bromhexansäure: 5 g (25.6 mmol, 1 Äq.) in 10 mL DMSO

NaN_3 : 8.37 g (128 mmol, 5 Äq.) in 200 mL DMSO

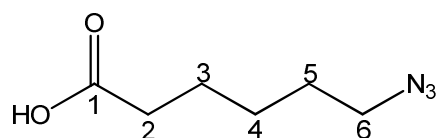
Ausbeute: 3.08 g (67%), als hellgelbe ölige Flüssigkeit

Ansatz nach AAV 2b

Bromhexansäure: 2 g (10.2 mmol, 1 Äq.) in 5 mL DMF

NaN_3 : 3.33 g (51.2 mmol, 5 Äq.) in 60 mL DMF

Ausbeute: 1.43 g (89%), als hellgelbe ölige Flüssigkeit



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 10.78 (s, 1H, OH), 3.25 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 2-H), 2.32 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 6-H), 1.73 – 1.52 (m, 4H, 5-, 3-H), 1.49 – 1.32 (m, 2H, 4-H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 177.74 (C-1), 51.20 (C-6), 40.19 33.84 (C-2), 28.52(C-5), 26.17 (C-4), 24.25 (C-3) ppm.

10-Azido-docanosäure (25)

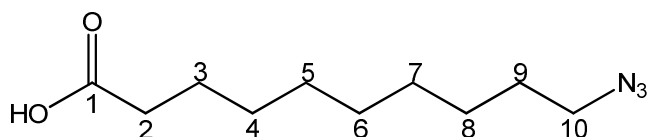
Ansatz nach AAV 2b

Bromdekansäure: 5 g (19.9 mmol, 1 Äq.) in 10 mL DMF

NaN₃: 6.47 g (99.5 mmol, 5 Äq.) in 150 mL DMF

Ausbeute: 3.77 g (89%), als hellbraune viskose Flüssigkeit

$R_f = 0.46$ (EE/Cy, 4:1)



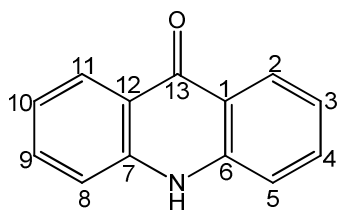
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 10.80 (s, 1H, OH), 3.24 (t, J = 6.9 Hz, 2H, 2-H), 2.33 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 10-H), 1.59 (dt, J = 18.2, 7.1 Hz, 4H, 3-, 9-H), 1.33 (d, J = 21.8 Hz, 10H, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-H) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 179.80 (C-1), 51.44 (C-10), 34.04 (C-2), 29.20 (C-9), 29.07 (C-4), 29.02 (C-5), 28.96 (C-6), 28.78 (C-7), 26.64 (C-8), 24.63 (C-3) ppm.

10H-Acridin-9-on (Acridon) (26)

20 g (93.86 mmol, 1 Äq.) *N*-Phenylanthranilsäure werden in 48.3 mL konz. H₂SO₄ gelöst und für 4 h bei 100 °C refluxiert. Für die Fällung des Feststoffs wird das heiße Reaktionsgemisch in 1 L siedendes Wasser gegeben. Nach 5 min weiterem Sieden wird der Feststoff abfiltriert. Der Niederschlag wird zusammen mit einer Lösung von 22.5 g NaHCO₃ in 400 mL H₂O für 5 min erhitzt. Nach der Filtration und anschließender Trocknung an einer HV-Pumpe erhält man 15.6 g (85%) Produkt als gelben Feststoff.

$R_f = 0.42$ (EE/Cy, 1:1)



^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 8.22 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 2H, 5-, 8-H), 7.71 (ddd, J = 8.1, 6.9, 1.7 Hz, 2H, 4-, 9-H), 7.53 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 2-, 11-H), 7.24 (m, 2H, 3-, 10-H), 2.50 (s, 1H, NH) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 176.7 (C-13), 140.8 (C-6, -7), 133.4 (C-4, -9), 125.9 (C-2, -11), 120.9 (C-1, -12), 120.9 (C-3, -10), 117.3 (C-5, -8) ppm.

10-(5-Bromopentyl)- 10*H*-acridin-9-on (Acr-Br) (27)

Ansatz I

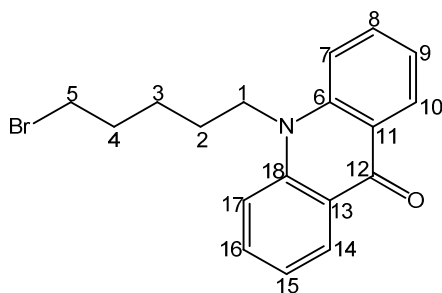
15.0 g (76.9 mmol) Acridon **26** werden in 380 mL 50%-iger NaOH-Lösung suspendiert. Eine Lösung von 105 mL (769 mmol, 10 Äq.) 1,5-Dibrompentan in 300 mL THF und 3.0 g (131 mmol, 0.17 Äq.) BTEAC werden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter Rückfluss für 20 h erhitzt. Nachdem die Reaktion beendet ist, wird die organische Phase abgetrennt. Restliches Produkt in der wässrigen Phase wird mit CHCl_3 (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das dunkelbraune Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Laufmittel Cy/EE, 2:1) aufgereinigt. Man erhält 18.1 g (60%) eines gelben Feststoffs als Produkt.

Ansatz II

Zu einer Lösung von 13.5 g (69.2 mmol, 1 Äq.) Acridon **26** in trockenem DMF (340 mL) werden 2.84 g (118.3 mmol, 1.7 Äq.) NaH bei RT unter einer N_2 -Schutzgasatmosphäre gegeben. Nach Beendigung der H_2 -Entwicklung werden 3.38 g KI zu der Reaktionsmischung gegeben und auf 10 °C abgekühlt. Anschließend werden 38.5 mL (284.6 mmol, 4 Äq.) 1,5-Dibrompentan der Mischung bei 0 ~ 10 °C tropfenweise hinzugefügt und dann über Nacht weiter gerührt. Die Reaktionsmischung wird eingengt und mit EE (2 x 100 mL) extrahiert.

Die vereinigten organischen Phasen werden dann mit einer ges. NaCl-Lösung (4 x 50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der ölige Rückstand mit 60 mL *n*-Pentan versetzt und das Produkt bei 4 °C auskristallisiert. Man erhält 15.0 g (63%) Produkt als gelben kristallinen Feststoff.

$R_f = 0.59$ (EE/Cy, 4:1)

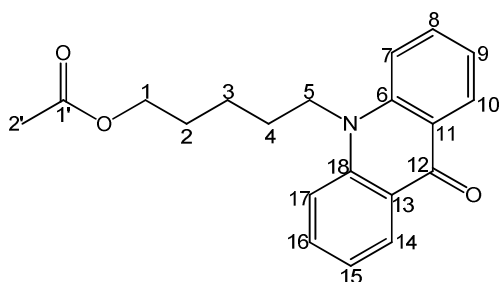


¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.47 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.68 (ddd, J = 8.7, 7.0, 1.7 Hz, 2H, 8-, 16-H), 7.38 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.23 (m, 2H, 9-, 15-H), 4.27 (t, 2H, 1-H), 3.40 (m, 2H, 5-H), 1.93 (m, 2H, 2-H), 1.89 (m, 4H, 4-, 3-H) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 178.8 (C-12), 142.1 (C-6, -18), 134.5 (C-8, -16), 128.5 (C-10, -14), 122.9 (C-11, -13), 121.7 (C-9, -15), 115.0 (C-7, -17), 46.3 (C-1), 33.6 (C-5), 32.5 (C-2), 27.4 (C-4), 25.7 (C-3) ppm.

5-(9-Oxo-9H-acridin-10-yl)-pentylacetat (28)

Die Reaktionsmischung aus 2 g (5.81 mmol, 1 Äq.) Acr-Br (**27**) und 4.80 g (58.5 mmol, 10 Äq.) NaOAc in 40 mL einer Lösungsmittel-Mischung (DMF/H₂O, 3:1) wird bei 60 °C über Nacht gerührt, anschließend mit 150 mL H₂O verdünnt und das Produkt mit CHCl₃ (3 x 20 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (1:2) als LM aufgereinigt. Man erhält 1.5 g (80%) gelben Feststoff.



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.48 (dd, J = 1.0, 5.8 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.64 – 7.60 (m, 2H, 8-, 16-H), 7.38 (t, J = 8.6 Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.36 (t, J = 7.7 Hz, 2H, 9-, 15-H), 4.23 (t, J = 8.3 Hz, 2H, 1-H), 3.99 (t, J = 6.7 Hz, 2H, 5-H), 1.95 (s, 3H, 2'-H), 1.86 (m, 2H, 2-H), 1.55 - 1.53 (m, 4H, 4-, 3-H) ppm.

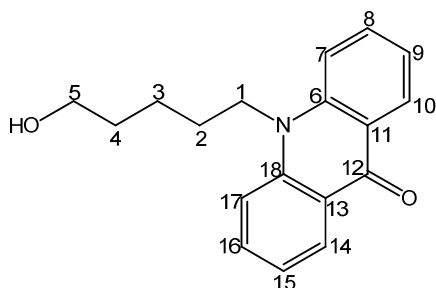
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 178.28 (C-1'), 171.71 (C-12), 142.11 (C-6, -18), 134.27 (C-8, -16), 128.38 (C-10, -14), 122.84 (C-11, -13), 121.60 (C-9, -15), 114.91 (C-7, -17), 64.80 (C-5), 46.48 (C-1), 28.85 (C-2), 27.39 (C-4), 24.15 (C-3) ppm.

10-(5-Hydroxypentyl)-10H-acridin-9-on (Acr-OH) (29)

1.5 g (4.64 mmol) Substrat (**28**) wird in 2 M NaOMe in MeOH suspendiert und gerührt bis keine weitere Umsetzung zu beobachten ist. Anschließend wird die Mischung filtriert und das Filtrat eingengt. Der Rückstand wird dann durch Säulenchromatographie mit Cy/EE (1:4) als LM aufgereinigt.

Ausbeute: 0.854 g (65%), als gelber Feststoff.

R_f = 0.40 (Cy/EE, 1:4)



¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 8.51 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.84 (t, J = 9.0 Hz, 2H, 8-, 16-H), 7.69 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.36 (t, J = 6.0 Hz, 2H, 9-, 15-H), 4.46 (t, J = 6.0 Hz, 2H, 1-H), 3.70 (t, J = 6.0 Hz, 2H, 5-H), 2.01 - 1.98 (m, 2H, 2-H), 1.73 - 1.69 (m, 4H, 4-, 3-H) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD): δ = 179.98 (C-12), 143.21 (C-6, -18), 135.79 (C-8, -16), 128.55 (C-10, -14), 123.24 (C-11, -13), 122.81 (C-9, -15), 116.60 (C-7, -17), 62.89 (C-5), 47.39 (C-1), 33.40 (C-2), 28.36 (C-4), 24.34 (C-3) ppm.

(*Z*)-10-[5-(4-Hydroxy-but-2-enyloxy)-pentyl]-acridin-9-on (30)

Ansatz nach AAV 1

NaH: 4.0 g (0.167 mol, 3.6 Äq.)

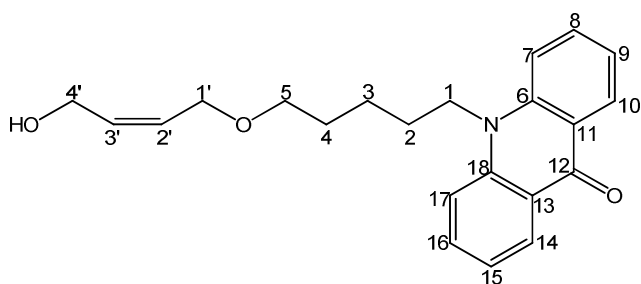
(*Z*)-But-2-en-1,4-diol: 20.4 g (0.232 mol, 5 Äq.);

Acr-Br (27): 15.9 g (0.046 mol, 1 Äq.)

THF: 600 mL

Ausbeute: 9.5 g (59%, bezogen auf Acr-Br), als hellgelber Feststoff nach der Chromatographie mit EE/Cy (1:1)

R_f = 0.30 (EE/Cy, 1:1)



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.56 (dd, 2H, J = 8.0, 1.7 Hz, H_{ar}), 7.71 (ddd, J = 8.7, 7.0, 1.8 Hz, 2H, H_{ar}), 7.38 (d, J = 8.7, 2H, H_{ar}), 7.23 (ddd, 2H, J = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, H_{ar}), 5.84 (m, 1H, 2'-H), 5.72 (m, 1H, 3'-H), 4.33 (t, 2H, 1-H), 4.23 (d, 2H, J = 6.4 Hz, 4'-H), 4.07 (d, 2H, J = 6.1 Hz, 1'-H), 3.48 (t, 2H, J = 5.9 Hz, 5-H), 2.23 (s, 1H, O-H), 1.94 (m, 2H, 2-H), 1.72 (m, 2H, 4-H), 1.63 (m, 2H, 3-H) ppm.

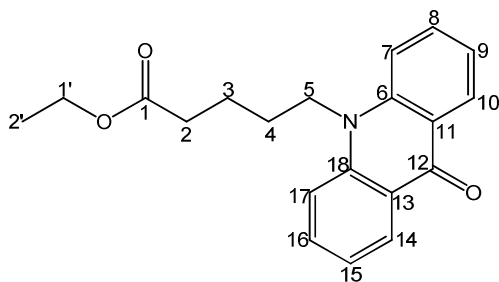
^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 178.0 (C-18), 141.7 (2 N-C_{ar}), 133.9 (2 C_{ar}), 132.4 (C-3'), 128.3 (C-2'), 128.0 (2 C_{ar}), 121.2 (2 C_{ar}), 114.53 (2 C_{ar}), 70.2 (C-5), 66.6 (C-4'), 58.8 (C-1'), 46.1 (C-1), 29.4 (C-2), 27.0 (C-4), 23.7 (C-3) ppm.

5-(9-Oxo-9*H*-acridin-10-yl)-pentansäureethylester (31)

Eine Mischung aus 1.836 g (45.9 mmol, 3 Äq.) NaH (60%) und 3,0 g (15.3 mmol, 1 Äq.) Acridon (**26**) in 50 mL DMF (wasserfrei) wird bei RT gerührt. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird die Reaktionsmischung mit 2.95 mL (18.7 mmol, 1.2 Äq.) Ethyl-5-brompentanoat versetzt und auf 80 °C erhitzt und gerührt, bis keine weitere Umsetzung beobachtet wird. Anschließend wird H_2O der Mischung zugegeben und 4x mit EE extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit EE/Cy (2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 3.068 g (62%), als gelber Feststoff

R_f = 0.44 (EE/Cy, 2:1)

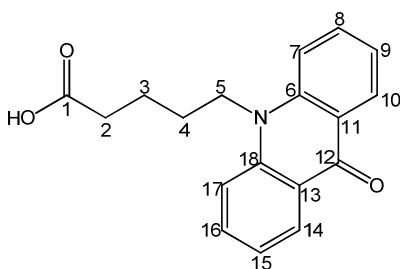


^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.50 (dd, J = 0.9, 4.8 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.66 – 7.62 (m, 4H, 8-, 16-H), 7.40 (d, J = 5.4 Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.22 – 7.19 (m, 2H, 9-, 15-H), 4.27 (t, J = 4.8 Hz, 2H, 5-H), 4.08 (q, J = 4.2 Hz, 2H, 1'-H), 2.38 (t, J = 4.2 Hz, 2H, 2-H), 1.92 – 1.87 (m, 2H, 4-H), 1.84 – 1.80 (m, 2H, 3-H), 1.18 (t, J = 4.2 Hz, 2H, 2'-H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 178.32 (C-1), 173.39 (C-12), 142.07 (C-6, -18), 134.33 (C-8, -16), 128.42 (C-10, -14), 122.88 (C-11, -13), 121.65 (C-9, -15), 114.81 (C-7, -17), 60.96 (C-1'), 46.16 (C-5), 34.14 (C-2), 26.98 (C-4), 22.57 (C-3), 14.64 (C-2') ppm.

5-(9-Oxo-9*H*-acridin-10-yl)-pentansäure (32)

Eine Mischung von 200 mg (0.618 mmol) **31** in 30 mL 10%-iger NaOH-Lösung wird unter Rückfluss über Nacht gerührt. Anschließend wird der pH-Wert der Mischung durch konz. HCl neutral eingestellt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand in 5 mL MeOH* suspendiert, filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Die Filtration wird dreimal wiederholt. Man erhält 0.179 g (98%) sauberes Produkt als gelben Feststoff.



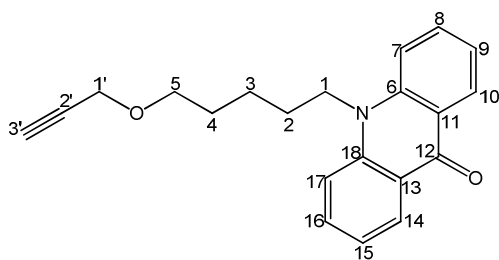
^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 8.33 (d, J = 6.0 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.83 – 7.82 (m, 4H, 8-, 9-, 16-, 15-H), 7.33 – 7.28 (m, 2H, 7-, 17-H), 4.45 (t, J = 6.0 Hz, 2H, 5-H), 2.05 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 2-H), 1.82 – 1.66 (m, 4H, 4-, 3-H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 177.42 (C-1), 176.43 (C-12), 141.42 (C-6, -18), 134.24 (C-8, -16), 126.64 (C-10, -14), 121.48 (C-11, -13), 121.11 (C-9, -15), 115.93 (C-7, -17), 45.42 (C-5), 38.60 (C-2), 26.80 (C-4), 23.31 (C-3) ppm.

10-(5-(Prop-2-yn-1-yloxy)-pentyl)-10*H*-acridin-9-on (33)

In einer Suspension von 1,0 g (2.9 mmol, 1 Äq.) Acr-Br (**27**) in 25 mL 50%-iger NaOH-Lösung wird eine Lösung von 0.168 mL (2.9 mmol, 1 Äq.) Propargylalkohol in 25 mL THF und 116 mg BTEAC bei RT zugegeben und über Nacht stark gerührt. Aus der Suspension ist nun eine klare Lösung geworden. Die THF-Phase wird dann abgetrennt und aus der wässrigen Phase wird das Produkt dreimal mit CHCl_3 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit EE/Cy (1:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.555 g (60%), als gelber Feststoff



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.57 (dd, J = 3.0, 9.0 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.74 – 7.68 (m, 2H, 8-, 16-H), 7.47 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.27 (t, J = 9.0 Hz, 2H, 9-, 15-H), 4.32 (t, J = 9.0 Hz, 2H, 1-H), 4.16 (d, J = 3.0 Hz, 2H, 1'-H), 3.59 (t, J = 6.0 Hz, 2H, 5-H), 2.43 (t, J = 3.0 Hz, 2H, 3'-H), 2.04 - 1.91 (m, 2H, 4-H), 1.80 – 1.63 (m, 4H, 2-, 3-H) ppm.

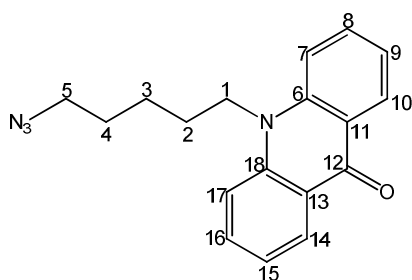
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 177.92 (C-12), 141.72 (C-6, -18), 133.87 (C-8, -16), 127.97 (C-10, -14), 122.45 (C-11, -13), 121.28 (C-9, -15), 114.53 (C-7, -17), 79.86 (C-2'), 74.33 (C-3'), 69.69 (C-5), 58.19 (C-1'), 46.10 (C-1), 29.20 (C-4), 26.87 (C-2), 23.65 (C-3) ppm.

10-(5-Azidopentyl)-10H-acridin-9-on (Acr-N₃) (34)

Eine Lösung von 11.5 g (33.4 mmol, 1 Äq.) Acr-Br (27) in 120 mL DMF wird mit einer Lösung von NaN_3 (21.7 g, 0.334 mol) in 40 mL H_2O gemischt. Zu der Mischung werden 500 mg Bu_4NBr gegeben. Nach dem Rühren bei RT über Nacht wird die Reaktionsmischung mit 50 mL DCM verdünnt. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung (2 x 60 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird in EE auskristallisiert.

Ausbeute: 8.6 g (84%), als gelber Feststoff.

R_f = 0.69 (EE/Cy, 4:1)



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.51 (dd, J = 3.0, 9.0 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.68 – 7.60 (m, 2H, 8-, 16-H), 7.40 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.21 (t, J = 9.0 Hz, 2H, 9-, 15-H), 4.30 (t, J = 9.0 Hz, 2H, 1-H), 3.28 (t, J = 6.0 Hz, 2H, 5-H), 1.94 - 1.86 (m, 2H, 2-H), 1.69 – 1.54 (m, 4H, 4-, 3-H) ppm.

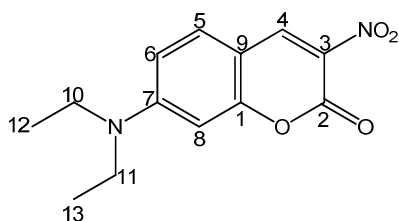
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 177.77 (C-12), 141.66 (C-6, -18), 134.05 (C-8, -16), 128.07 (C-10, -14), 122.34 (C-11, -13), 121.42 (C-9, -15), 114.41 (C-7, -17), 51.24 (C-5), 45.93 (C-1), 28.74 (C-2), 26.83 (C-4), 24.14 (C-3) ppm.

3-Nitro-7-diethylamino-cumarin (NO_2 -Coum-NEt₂) (36)

In eine Lösung von 2.4 g (12.4 mmol, 1 Äq.) 4-Diethylamino-Salicylaldehyd werden 4 Å Molsiebe, 1.6 mL (14.4 mmol, 1.2 Äq.) Ethylnitroacetat, 0.2 mL Piperidin und 0.4 mL Essigsäure in 35 mL n-Butanol bei RT unter Argon als Schutzgas gegeben. Diese Mischung wird dann auf 120 °C erhitzt und über Nacht gerührt. Anschließend wird eine Fritte abgesaugt und einmal mit warmen DMF gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingedunstet. Der erhaltene Rückstand wird in DMF bei 80 °C gelöst und in Eiswasser eingerührt. Der erhaltene orangefarbene Feststoff wird abgenutscht und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 2.863 g (88%), als oranger Feststoff

R_f = 0.56 (EE/Cy, 2:1)



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.69 (s, 1H, 4-H), 7.43 (d, J = 9.1 Hz, 1H, 5-H), 6.71 (d, J = 9.1 Hz, 1H, 6-H), 6.46 (d, J = 2.3 Hz, 1H, 8-H), 3.50 (q, J = 7.2 Hz, 4H, 10-, 11-H), 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 6H, 12-, 13-H) ppm.

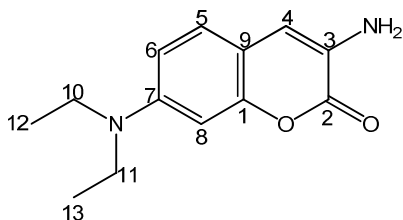
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 158.73 (C-2), 154.61 (C-1), 153.47 (C-7), 143.34 (C-4), 132.60 (C-5), 126.64 (C-3), 111.21 (C-6), 106.18 (C-9), 96.72 (C-8), 45.54 (C-10, -11), 12.41 (C-12, -13) ppm.

3-Amino-7-diethylamino-cumarin (NH₂-Coum-NEt₂) (37)

In eine Suspension von 3.2 g (14.26 mmol, 7.5 Äq.) SnCl₂·2H₂O in konz. HCl werden 0.5 g (1.9 mmol, 1 Äq.) NO₂-Coum-NEt₂ (36) bei RT langsam (ca. 1 h) zugegeben. Nach 5-stündigem Rühren bei RT werden 40 g Eis in die Mischung gegeben. Anschließend wird der pH-Wert mit 5 M NaOH-Lösung auf 8 eingestellt. Man extrahiert mit Et₂O (2 x 100 mL). Die organische Phase wird mit H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 408 mg (92%), als goldfarbener Feststoff

R_f = 0.08 (EE/Cy, 2:1)



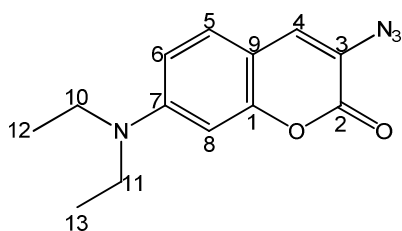
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.12 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, 5-H), 6.71 (s, 1H, 4-H), 6.59 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H, 6-H), 6.54 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 8-H), 3.89 (s, 2H, NH₂), 3.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, 10-, 11-H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, 12-, 13-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 160.33 (C-2), 151.62 (C-1), 147.50 (C-7), 127.54 (C-3), 125.95 (C-5), 114.44 (C-4), 109.71 (C-9), 109.35 (C-6), 98.04 (C-8), 44.63 (C-10, -11), 12.50 (C-12, -13) ppm.

3-Azido-7-diethylamino-cumarin (Coum-NEt₂) (38)

Eine Lösung von 68.1 mg (1.135 mmol, 1 Äq.) NaNO₂ in 1 mL H₂O wird in eine Lösung von 264 mg (1.137 mmol, 1 Äq.) NH₂-Coum-NEt₂ (37) in 11 mL HCl (17.2%) langsam (über ca. 25 min) bei 0 °C zugetropft. Nach 1.5-stündigem Rühren bei 0 °C wird eine Lösung von 5.28 g NaOAc in 13.2 mL H₂O der Mischung bei 0 °C zugegeben, um den pH-Wert auf einen Wert von 2 ~ 4 einzustellen. Anschließend werden 147 mg NaN₃ langsam (ca. 20 min) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 0 °C weiter für 5 h gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit kaltem Wasser fünfmal gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wird bei – 20 °C aufbewahrt.

Ausbeute: 251 mg (85%), als gelbgrüner Feststoff



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 5-H), 6.71 (s, 1H, 4-H), 6.59 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H, 6-H), 6.54 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 8-H), 3.89 (s, 2H, NH₂), 3.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, 10-, 11-H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, 12-, 13-H) ppm.

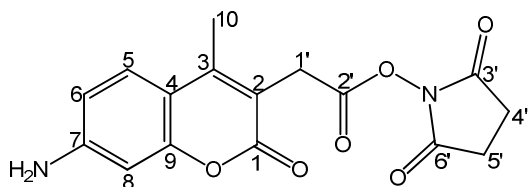
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 158.39 (C-2), 154.16 (C-1), 149.84 (C-7), 128.15 (C-5), 127.62 (C-4), 119.52 (C-3), 109.46 (C-6), 108.00 (C-9), 97.36 (C-8), 44.79 (C-10, -11), 12.43 (C-12, -13) ppm.

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-acetat (39)

In einer farblosen klaren Lösung von 30 mg (0.129 mmol, 1 Äq.) 2-(7-Amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-essigsäure in 3 mL THF* werden 26.5 mg (0.129 mmol, 1 Äq.) DCC und 14.8 mg (0.129 mmol, 1 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid bei 0 °C unter Argon als Schutzgas zugegeben. Diese Mischung wird bei 0 °C unter Argon weiter für 2 h und dann bei 4 °C über

Nacht gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung zentrifugiert und der Überstand im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 41 mg (96%), als farbloser Feststoff



^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 7.68 (d, J = 6.0 Hz, 1H, 5-H), 6.81 (dd, J = 6.0, 9.0 Hz, 1H, 6-H), 6.72 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 8-H), 4.02 (s, 2H, 1'-H), 2.79 (s, 4H, 4', 5'-H), 2.40 (s, 3H, 10-H) ppm.

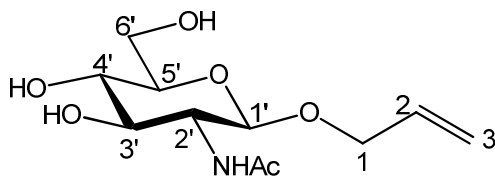
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 169.99 (C-3', -6'), 166.46 (C-2'), 160.84 (C-1), 160.62 (C-9), 153.60 (C-7), 151.05 (C-3), 127.07 (C-5), 113.22 (C-6), 112.83 (C-2), 111.90 (C-4), 102.03 (C-8), 29.49 (C-1'), 25.41 (C-5', -4'), 15.10 (C-10) ppm.

Allyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (GlcNAc- β -Ally) (40)

In eine Suspension von 1.556 g (17.92 mmol, 2 Äq.) LiBr und 2,0 g (9.04 mmol, 1 Äq.) GlcNAc in DMF (wasserfrei) werden 0.3 g NaH und 3.256 g (26.91 mmol, 3 Äq.) Allylbromid bei RT unter Argon als Schutzgas zugegeben. Nach 2-stündigem Rühren wird die Mischung bis auf ca. 10 mL im Vakuum eingeeengt und auf eine mit Kieselgel (Korngröße 63-200 μm) gefüllten Säule gegeben. Anschließend wird das Produkt mit EE/MeOH (4:1) eluiert.

Ausbeute: 1.038 g (44%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.29 (C/M, 4:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.86 (dddd, J = 16.9, 10.5, 6.2, 5.2 Hz, 1H, 2-H), 5.24 (ddq, J = 19.5, 10.5, 1.4 Hz, 2H, 3-H), 4.52 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 1'-H), 4.29 (ddt, J = 13.2, 5.2, 1.4 Hz, 1H, 1a-H), 4.12 (ddt, J = 13.2, 6.3, 1.3 Hz, 1H, 1b-H), 3.88 (dd, J = 12.3, 1.5 Hz, 1H, 6'-a-H), 3.70 (dd, J = 10.9, 4.2 Hz, 1H, 6'-b-H), 3.67 (dd, J = 10.3, 8.5 Hz, 1H, 2'-H), 3.50 (dd, J = 10.3, 8.8 Hz, 1H, 3'-H), 3.41 - 3.38 (m, 2H, 5'-, 4'-H), 1.99 (s, 1H, COCH_3) ppm.

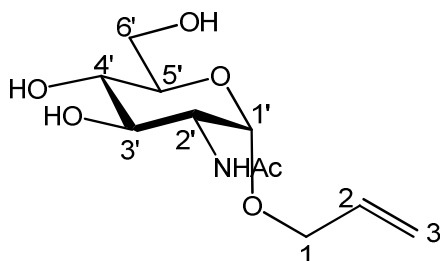
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 175.02 (COCH_3), 133.79 (C-2), 118.57 (C-3), 100.49 (C-1'), 76.29 (C-5'), 74.28 (C-3'), 70.84 (C-1), 70.35 (C-4'), 61.17 (C-6'), 55.95 (C-2'), 22.57 (COCH_3) ppm.

Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (GlcNAc- α -Allyl) (41)

1.26 mL (17.7 mmol, 3.4 Äq.) AcCl werden bei 0 °C unter Argon als Schutzgas tropfenweise in eine Mischung von 1.15 g (5.20 mmol, 1 Äq.) GlcNAc in 9.6 mL (140 mmol, 27 Äq.) Allylkohol gegeben. Die Reaktionsmischung wird auf 70 °C erhitzt und gerührt bis keine weitere Umsetzung auf dem DC zu beobachten ist. Dann wird NaHCO_3 zugegeben, um den pH-Wert auf 7 einzustellen. Anschließend wird die Mischung durch Kieselgur abgesaugt. Das Filtrat wird im Vakuum eingedunstet und der Rückstand säulenchromatographisch mit C/M (6:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.595 g (44%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.38 (C/M, 4:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.95 (ddd, J = 22.1, 10.8, 5.6 Hz, 1H, 2-H), 5.34 (dd, J = 17.3, 1.6 Hz, 1H, 3a-H), 5.21 (dd, J = 10.4, 1.2 Hz, 1H, 3b-H), 4.86 (d, J = 3.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.22 (dd, J = 13.2, 5.1 Hz, 1H, 1a-H), 4.02 (dd, J = 13.2, 6.1 Hz, 1H, 1b-H), 3.92 (dd, J = 10.7, 3.6 Hz, 1H, 2'-H), 3.84 (dd, J = 12.0, 2.2 Hz, 1H, 6'-a-H), 3.78 - 3.68 (m, 2H, 6'-b-,

3'-H), 3.64 (ddd, $J = 9.8, 5.4, 2.2$ Hz, 1H, 5'-H), 3.43 (t, $J = 9.4$, 1H, 4'-H), 2.03 (s, 1H, COCH₃) ppm.

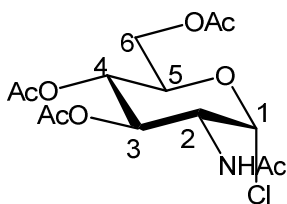
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): $\delta = 176.82$ (COCH₃), 137.85 (C-2), 120.57 (C-3), 100.18 (C-1'), 76.31 (C-5'), 75.19 (C-3'), 74.59 (C-4'), 71.86 (C-1), 64.99 (C-6'), 57.90 (C-2'), 22.57 (COCH₃) ppm.

2-Acetamido-2-desoxy- 3,4,5-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylchlorid (42)

Eine Suspension aus 30 g (0.136 mol) GlcNAc in 95 mL (1.331 mol, 10 Äq.) Acetylchlorid wird über Nacht unter Argon gerührt. Die entstehende, rötliche Lösung wird mit 70 mL CHCl₃ verdünnt und auf ca. 1 L Eiswasser gegossen. Die abgetrennte, organische Phase wird mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung neutralisiert und über MgSO₄ getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt über Kieselgel (Laufmittel Cy/EE, 1:2) in einer dickeren Säule ($\varnothing = 8.5$ cm, $l = 12$ cm) schnell aufgereinigt. Das erhaltene Produkt wird aus CHCl₃/Et₂O (1:6) umkristallisiert.

Ausbeute: 18.8 g (40%), als farblose Kristalle

$R_f = 0.29$ (Cy/EE, 1:1); $R_f = 0.43$ (Cy/EE, 2:3)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.13$ (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, 1-H), 5.81 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, NH), 5.26 (dd, $J = 10.6, 9.5$ Hz, 1H, 3-H), 5.15 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, 4-H), 4.47 (ddd, $J = 10.7, 8.8, 3.7$ Hz, 1H, 2-H), 4.29 – 4.14 (m, 2H, 6a-, 5-H), 4.07 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, 6b-H), 2.04 (s, 3H, NHCOCH₃), 1.99 (s, 6H, COCH₃), 1.92 (s, 3H, COCH₃) ppm.

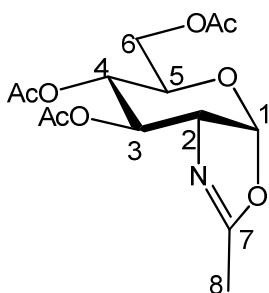
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.69, 170.78, 170.47, 169.38$ (COCH₃), 94.04 (C-1), 71.18 (C-5), 70.52 (C-3), 67.49 (C-4), 61.44 (C-6), 53.81 (C-2), 23.38, 21.04 20.91 (COCH₃).

2-Methyl-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-1,2-didesoxy- α -D-glucopyrano)-[2,1- Δ]-2-oxazolin (43)

Ein Gemisch aus 3.8 g (10.4 mmol) 2-Acetamido-1-chloro-3,4,6-*O*-tri-acetyl- α -D-glucosamin (42), 1.75 g (20.8 mmol) NaHCO₃ und 2.70 g (9.25 mmol) Tetrabutylammoniumchlorid wird in einem Zweihals-Kolben in 20 mL Acetonitril suspendiert. Die Reaktionsmischung wird für drei Stunden bei 55°C unter Argon und Rückfluss erhitzt und anschließend zur Trockene eingedampft. Der braune Rückstand wird in 100 mL CH₂Cl₂ aufgenommen, mit H₂O (3 x 60 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die organische Phase wird eingengt und durch Flash-Säulenchromatographie (Laufmittel Cy/EE, 1:8) aufgereinigt.

Ausbeute: 2.87 g (84%), als hellgelber Sirup.

$R_f = 0.21$ (Cy/EE, 1:8); $R_f = 0.13$ (Cy/EE, 1:2); $R_f = 0.40$ (CHCl₃/MeOH, 10:1)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.90$ (d, 1 H, $J = 7.3$ Hz, 1-H), 5.19 (dd, 1 H, $J = 9.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz 3-H), 4.85 (d, 1 H, $J = 9.2$ Hz, 4-H), 4.10 (m, 2 H, 6a-, 6b-H), 4.06 (m, 1 H, 2-H), 3.53 (m, 1 H, 5-H), 2.12 , 2.04 , 2.02 (s, 3 H, COCH₃), 2.01 (d, 3 H, $J = 2.9$, 8-H) ppm.

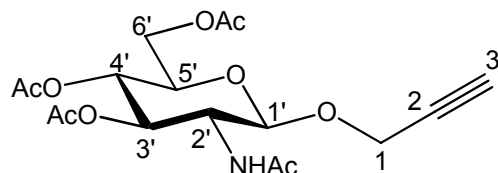
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.7$ (COCH₃), 171.6 (COCH₃), 171.3 (COCH₃), 168.7 (C-7), 101.5 (C-1), 72.8 (C-3), 71.8 (C-5), 69.7 (C-4), 63.7 (C-6), 62.5 (C-2), 22.9 , 22.8 , 22.7 (COCH₃), 16.3 (C-8) ppm.

Propargyl-3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (44)

Eine Mischung aus 950 mg (2.6 mmol, 1 Äq.) GlcNAcAc₃-Cl (42) und 610 mg (2.6 mmol, 1 Äq.) Hg(CN)₂ in 10 mL Propargylalkohol wird bei RT gerührt. Nach 28 h zeigt die DC-Kontrolle eine vollständige Umsetzung. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung mit

CHCl₃ verdünnt, und mit H₂O (3 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wird in EtOH umkristallisiert.

Ausbeute: 502 mg (50%), als hellgelber Feststoff



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH), 5.22 (dd, *J* = 10.6, 9.4 Hz, 1H, 3'-H), 5.03 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H, 4'-H), 4.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 1'-H), 4.32 (d, *J* = 2.4, 1.1 Hz, 1H, 1-H), 4.19 (dd, *J* = 12.4, 4.7 Hz, 1H, 6'a-H), 4.09 (dd, *J* = 12.3, 2.4 Hz, 1H, 6'b-H), 3.89 (q, *J* = 8.7 Hz, 1H, 2'-H), 3.67 (ddd, *J* = 9.9, 4.6, 2.4 Hz, 1H, 5'-H), 2.02 (s, 3H, NHCOCH₃), 1.97, 1.96, 1.90 (s, 9H, COCH₃) ppm.

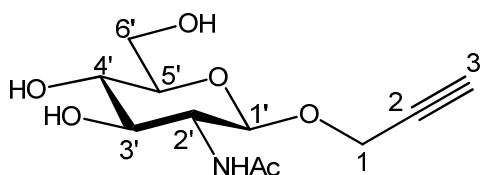
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 171.34, 171.13, 170.80, 169.77 (COCH₃), 98.7 (C-1'), 78.89 (C-2), 75.81 (C-3), 72.77 (C-3'), 72.32 (C-5'), 68.83 (C-4'), 62.31 (C-6'), 56.29 (C-1), 54.61 (C-2'), 23.74 (NHCOCH₃), 21.14, 21.09, 21.03 (COCH₃) ppm.

Propargyl-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosid (GlcNAc-β-Prop) (45)

n eine Suspension von 0.516 g (2.35 mmol, 1 Äq.) GlcNAc in 5 mL DMF (wasserfrei) werden 0.408 g (4.70 mmol, 2 Äq.) LiBr, 0.13 g (3.25 mmol, 1.4 Äq.) 0,122 g (3.05 mmol, 1.3 Äq.) NaH (60%-ig) und 1.4 mL (7.53 mmol, 3.2 Äq.) Propargylbromid (80%) bei RT unter Argon als Schutzgas zugegeben. Nach 4-stündigem Rühren wird die Mischung mit 30 mL H₂O verdünnt und mit Et₂O (3 x 10 mL) gewaschen. die wässrige Phase wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit C/M (2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.535 g (88%), als hellgelber Feststoff

R_f = 0.32 (C/M, 2:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 4.66 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 1'-H), 4.36 (d, J = 2.4 Hz, 2H, 1-H), 3.87 (dd, J = 12.4, 1.9 Hz, 1H, 6'a-H), 3.69 (dd, J = 12.4, 5.5 Hz, 1H, 6'b-H), 3.65 (dd, J = 10.3, 8.5 Hz, 1H, 2'-H), 3.51 (dd, J = 10.3, 8.6 Hz, 1H, 3'-H), 3.45 – 3.36 (m, 2H, 5'-, 4'-H), 2.86 (t, J = 2.4 Hz, 1H, 3-H), 1.99 (d, J = 4.8 Hz, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 174.75 (COCH_3), 99.44 (C-1'), 78.86 (C-2), 76.16 (C-5'), 75.98 (C-3), 73.76 (C-3'), 69.85 (C-4'), 60.69 (C-6'), 56.67 (C-1), 55.35 (C-2'), 22.23 (COCH_3) ppm.

Propargyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (GlcNAc- α -Prop) (46)

Ansatz I nach AAV 3d

GlcNAc: 3.0 g (13.56 mmol, 1 Äq.)

Propargylalkohol: 37.958 g (678 mmol, 50 Äq.)

TMSCl : 14.7 g (136 mmol, 10 Äq.)

Ausbeute: 2.1 g (61%), als farbloser Feststoff nach Säulenchromatographie (C/M, 5:1)

Ansatz II

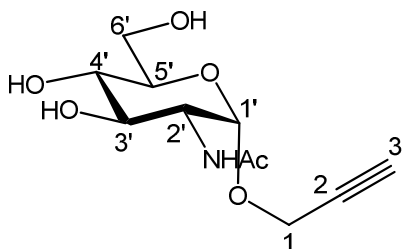
In eine Suspension von 2.0 g (9.04 mmol, 1 Äq.) GlcNAc in 8 mL Propargylalkohol werden 156 mg H_2SO_4 -Kieselgel bei 65 °C zugegeben. Diese Mischung wird über Nacht bei 65 °C gerührt und anschließend auf eine mit Flash-Kieselgel gefüllte Säule gegeben. Das Produkt wird durch DCM eluiert. Man erhält nach Abrotieren des Laufmittels 1.05 g (45%) des α -Produkts und 0.89 g (38%) des β -Produkts, jeweils als farbloser Feststoff.

R_f = 0.47 (C/M, 2:1) für GlcNAc- α -Propargyl (46)

R_f = 0.32 (C/M, 2:1) für GlcNAc- β -Propargyl (45)

Ansatz III

Eine Mischung aus 456 mg (2.06 mmol) GlcNAc und 440 mg H^+ -Ionenaustauscher in 20 mL Propargylalkohol wird unter Rückfluss für 1.5 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie mit C/M (5:1) aufgereinigt. Man erhält 201 mg (38% Ausbeute) sauberes Produkt als hellbräunen Feststoff.



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 5.00 (d, J = 3.7 Hz, 1H, 1'-H), 4.26 (qd, J = 16.1, 2.4 Hz, 2H, 1-H), 3.89 (dd, J = 10.7, 3.7 Hz, 1H, 2'-H), 3.81 (dd, J = 12.3, 2.3 Hz, 1H, 6'a-H), 3.74 (dd, J = 12.3, 5.0 Hz, 1H, 6'b-H), 3.71 – 3.65 (m, 2H, 5'-, 3'-H), 3.46 (dd, J = 9.8, 9.2 Hz, 1H, 4'-H), 2.85 (t, J = 2.4 Hz, 1H, 3-H), 1.99 (s, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 174.50 (COCH_3), 95.99 (C-1'), 79.10 (C-2), 75.87 (C-3), 72.31 (C-5'), 70.90 (C-3'), 69.85 (C-4'), 60.40 (C-6'), 55.14 (C-1), 53.41 (C-2'), 21.90 (COCH_3) ppm.

Propargyl-2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-(phenylmethandiyl)- α -D-glucopyranosid (47)

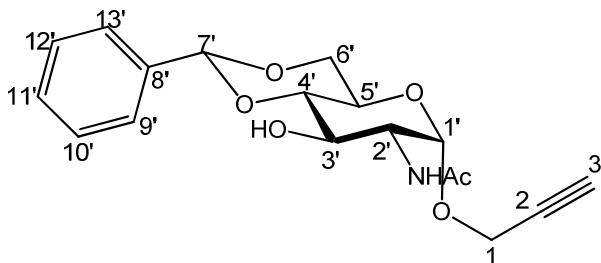
GlcNAc: 3.0 g (13.56 mmol, 1 Äq.)

Propargylalkohol: 38.0 g (678 mmol, 50 Äq.)

TMSCl: 14.7 g (136 mmol, 10 Äq.)

Die Reaktion wird zunächst nach AAV 3d durchgeführt. Vor der Aufreinigung durch Säulenchromatographie wird das Rohprodukt mit Toluol (2 x 15 mL) versetzt und am Rotationsverdampfer getrocknet. Der Rückstand wird dann in 40 mL CH_3CN gelöst. Man gibt 3.05 mL $\text{PhCH}(\text{OMe})_2$ und 0.258 g TosOH hinzu. Diese Mischung wird bei RT für 5 h gerührt. Anschließend werden 80 mL ges. NaHCO_3 -Lösung der Mischung zugegeben und für 1 h

gerührt. Der entstehende braune Feststoff wird abgesaugt, mit H₂O und Et₂O/Hexan (1:1) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält 2.2 g (47%) Produkt als braunen Feststoff.

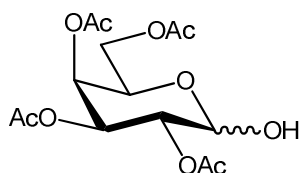


¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 7.46 (m, 2H, H_{ar}), 7.38 (m, 3H, H_{ar}), 5.61 (s, 1H, 7'-H), 4.89 (d, J = 3.3 Hz, 1H, 1'-H), 4.26 (d, 2H, 1-H), 4.18 (dd, J = 9.1, 3.9 Hz, 1H, 6'-a-H), 3.87 (d, J = 9.3 Hz, 1H, 2'-H), 3.73 - 3.67 (m, 3H, 6'-b-, 5'-, 3'-H), 3.53 - 3.36 (m, 2H, 4'-, 3-H), 1.85 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ = 169.89 (COCH₃), 138.07 (C-8'), 129.23 (C-11'), 128.38 (C-10', -12'), 126.74 (C-9', -13'), 101.24 (C-7'), 96.92 (C-1'), 82.26 (C-4'), 79.97 (C-2), 77.75 (C-3), 68.15 (C-6'), 67.56 (C-3'), 63.33 (C-5'), 54.86 (C-1), 54.30 (C-2'), 22.86 (COCH₃) ppm.

1-Trichloro-acetimidat-2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosid (49)

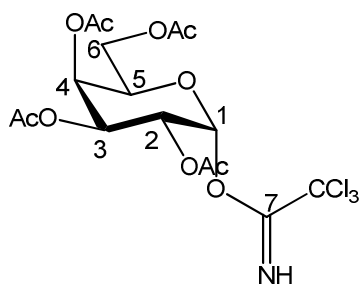
Zu einer Lösung von 6.6 g (17 mmol, 1 Äq.) peracetylierten Galactosiden (GalAc₅) in 15 mL DMF werden bei 50 °C 1.6 g (17 mmol, 1 Äq.) Hydrazinacetat gegeben. Die Reaktionsmischung wird 5 min gerührt und dann auf RT abgekühlt. Diese Mischung wird mit 200 mL EE verdünnt und mit H₂O (2 x 180 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält das Rohprodukt GalAc₄-1-OH (**48**) als farblosen Sirup, der ohne weitere Aufarbeitung für die Folgereaktion eingesetzt wird.



Zu einer Lösung von 5.5 g (15.4 mmol, 2 Äq.) GalAc₄-1-OH (**48**) in 130 mL CH₂Cl₂ werden 32 mL (0.320 mol, 42 Äq.) CCl₃CN und 1.1 mL (7.4 mmol, 1 Äq.) DBU bei etwa -10 bis -5 °C gegeben. Nach der Zugabe von DBU ändert sich die Farbe der Reaktionsmischung von gelb nach orangebraun. Die Reaktionsmischung wird bei -5 °C für 2 h gerührt. Nach der Entfernung der flüchtigen Komponenten wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (Cy/EE, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.1 g (49%, bezogen auf GalAc₅), als farbloser Feststoff

R_f = 0.30 (Cy/EE, 2:1)

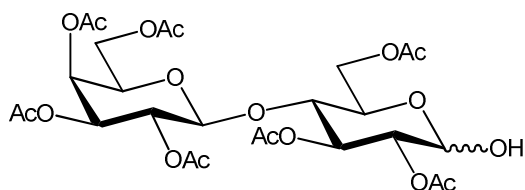


¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.60 (s, 1H, NH), 6.54 (d, 1H, J = 3.5 Hz, 1-H), 5.49 (dd, 1H, J = 1.2, 3.2 Hz, 4-H), 5.36 (dd, 1H, J = 3.2, 10.9 Hz, 3-H), 5.30 (dd, 1H, J = 3.5, 10.8 Hz, 2-H), 4.37 (td, 1H, J = 0.9, 6.7 Hz, 5-H), 4.10 (dd, 1H, J = 6.6, 11.3 Hz, 6a-H), 4.02 (dd, 1H, J = 6.7, 11.3 Hz, 6b-H), 2.10, 1.96, 1.95, 1.94 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 171.2, 171.0, 171.0, 170.9 (COCH₃), 161.9 (C_{imin}), 94.5 (C-1), 91.8 (CCl₃), 70.0 (C-5), 68.5 (C-4), 68.4 (C-3), 67.9 (C-2), 62.2 (C-6), 21.6, 21.6, 21.5, 21.5 (COCH₃) ppm.

1-Trichlor- acetimidat -2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosid (51)

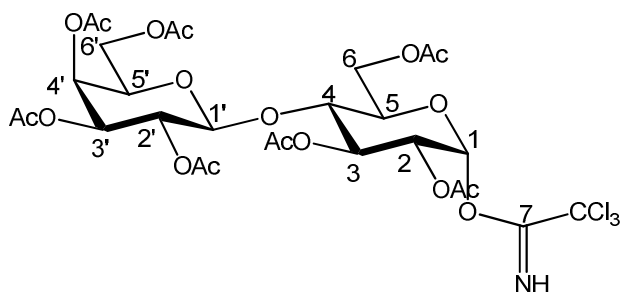
Zu einer Lösung von 2.0 g (2.947 mmol, 1 Äq.) peracetylierten Lactosiden (LacAc₈) in 5.0 mL DMF werden bei 52 °C 0.299 g (3.242 mmol, 1.1 Äq.) Hydrazinacetat gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 1 h bei 55 °C gerührt, danach mit 20 mL EE verdünnt und mit H₂O (2 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt LacAc₇-1-OH (**50**) wird als farbloser Sirup erhalten und ohne weitere Aufreinigung für die Folgereaktion eingesetzt.



Zu einer Lösung von 1.98 g (3.048 mmol, 2 Äq.) Rohprodukt LacAc₇-1-OH (**50**) in 26 mL getrockneten CH₂Cl₂ werden bei 0 °C 6.40 mL (64 mmol, 42 Äq.) CCl₃CN und 1.52 mL (1.524 mmol, 1 Äq.) DBU zugegeben. Nach der Zugabe von DBU ändert sich die Farbe der Reaktionsmischung von hellgelb nach braunrot. Die Mischung wird für 2 h bei 0 °C gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Komponenten wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (Cy/EE, 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.46 g (63%, bezogen auf LacAc₈), als hellgelber Schaum

$R_f = 0.36$ (EE/CH₂Cl₂ = 1:9); $R_f = 0.21$ (EE/Cy = 1:1); $R_f = 0.49$ (EE/Cy = 2:1)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.67 (s, 1H, NH), 6.50 (d, 1H, J = 3.8 Hz, 1-H), 5.57 (t, 1H, J = 9.7 Hz, 3-H), 5.37 (d, 1H, J = 3.3 Hz, 4'-H), 5.14 (dd, 1H, J = 7.9, 10.3 Hz, 2'-H), 5.08 (dd, 1H, J = 3.8, 10.1 Hz, 2-H), 4.98 (dd, 1H, J = 3.0, 10.4 Hz, 3'-H), 4.54 (d, 1H, J = 7.9

Hz, 1'-H), 4.49 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, 6a-H), 4.14 (m, 4H, 6b-H, 5-H, 6'-H), 3.90 (m, 2H, 4-H, 5'-H), 2.16, 2.13, 2.08, 2.08, 2.05, 2.02, 1.98, (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.10, 172.01, 171.90, 171.85, 171.84, 171.12, 170.82$, (COCH₃), 162.76 (C_{imin}), 102.99 (C-1'), 94.67 (C-1), 92.46 (CCl₃), 77.68 (C-4), 72.90 (C-3'), 72.70 (C-5), 72.50 (C-5'), 71.74 (C-2), 71.35 (C-3), 70.91 (C-2'), 68.37 (C-4'), 63.28 (C-6), 62.55 (C-6'), 22.64, 22.58, 22.41, 22.27, 22.24 (COCH₃) ppm.

Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-galactosyl-(1→3)-2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-(phenylmethandiyl)- α -D-glucopyranosid (52)

Ansatz nach AAV 3c

Gly-Prop (47): 1.0 g (2.88 mmol, 1 Äq.)

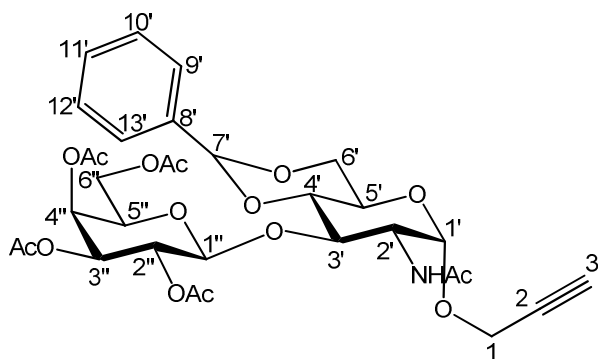
GalAc₄-NHCCl₃ (49): 2.8 g (5.76 mmol, 2 Äq.)

TMSOTf: 0.18 mL (1.44 mmol, 0.5 Äq.)

Molsieb: 4 Å

DCM (wasserfrei): 25 mL

Ausbeute: 1.03 g (53%), als hellbrauner Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit EE/Cy (2:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.36$ (m, 2H, H_{ar}), 7.23 (m, 3H, H_{ar}), 5.59 (d, 1H, NH), 5.44 (s, 1H, 7'-H), 5.18 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, 4''-H), 5.07 (dd, $J = 10.4, 8.0$ Hz, 1H, 2''-H), 4.89 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, 1'-H), 4.84 (dd, $J = 10.4, 3.4$ Hz, 1H, 3''-H), 4.57 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H,

1''-H), 4.21 (dt, $J = 10.7, 3.7$ Hz, 1H, 2'-H), 4.12 – 4.10 (m, 3H, 1-, 6'a-H), 3.96 (m, 1H, 6''a-H), 3.86 – 3.81 (m, 2H, 3'-, 6''b-H), 3.74 (m, 1H, 5'-H), 3.67 – 3.59 (m, 3H, 5''-, 6''b-, 4-H), 2.34 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, 3-H), 2.03, 1.98, 1.94, 1.90, 1.83 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.46, 170.64, 170.55, 170.30, 170.11$ (COCH₃), 137.62 (C-8'), 129.41 (C-11'), 128.54 (C-10', -12'), 126.33 (C-9', -13'), 101.46 (C-7'), 101.31 (C-1'), 97.51 (C-1'), 80.56 (C-4'), 78.83 (C-2), 76.48 (C-3'), 75.58 (C-3), 71.38 (C-3'), 70.86 (C-5'), 69.99 (C-2'), 69.04 (C-6'), 67.19 (C-4'), 63.87 (C-5'), 61.40 (C-6'), 55.62 (C-1), 52.74 (C-2'), 23.59, 21.38, 21.11, 20.96, 20.90 (-COCH₃) ppm.

Propargyl-hepta-*O*-acetyl-lactosyl-(1→3)-2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-(phenylmethandiyl)- α -D-glucopyranosid (53)

Ansatz nach AAV 3c

Gly-Prop (47): 0.295 g (0.849 mmol, 1 Äq.)

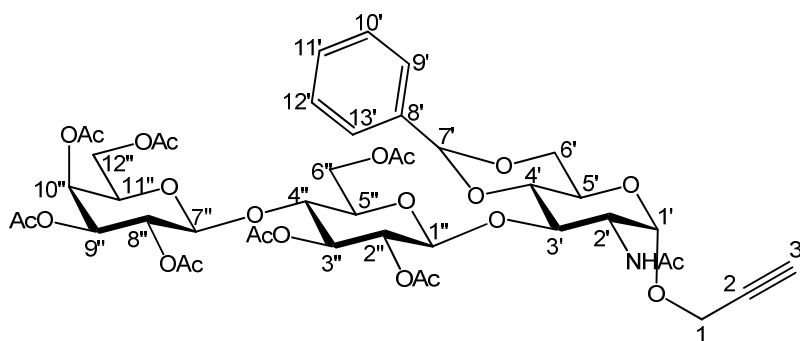
LacAc₇-NHCCl₃ (51): 1.332 g (1.706 mmol, 2 Äq.)

AgOTf: 55 mg (0.214 mmol, 0.25 Äq.)

Molsieb: 4 Å

DCM (wasserfrei): 15 mL

Ausbeute: 114 mg (14%), als farbloser Sirup nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit EE/Cy (4:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.41 (m, 2H, H_{ar}), 7.29 (m, 3H, H_{ar}), 5.63 (d, J = 9.3 Hz, 1H, NH), 5.51 (s, 1H, 7'-H), 5.25 (dd, J = 10.4, 3.4 Hz, 1H, 3''-H), 5.03 (d, J = 10.4, 7.9 Hz, 1H, 8''-H), 4.90 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.83 (dd, J = 10.4, 3.5 Hz, 1H, 9''-H), 4.78 (dd, J = 7.5, 8.9 Hz, 1H, 2''-H), 4.65 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 1''-H), 4.31 (m, 1H, 2'-H), 4.28 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 7''-H), 4.21 – 4.14 (m, 4H, 6''a-, 1-, 6'a-H), 4.01 (m, 2H, 12''-H), 3.87 (dd, J = 10.1, 9.1 Hz, 1H, 3'-H), 3.79 – 3.64 (m, 6H, 5'-, 6''b-, 11''-, 6'b-, 4''-, 4'-H), 2.42 (t, J = 2.4 Hz, 1H, 3-H), 2.06, 1.98, 1.97, 1.97, 1.95, 1.94, 1.89, 1.88 (s, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 171.50, 170.75, 170.70, 170.48, 170.37, 170.16, 170.05, 169.34 (COCH_3), 137.66 (C-8'), 129.59 (C-11'), 128.65 (C-10', -12'), 126.62 (C-9', -13'), 101.93 (C-7'), 101.45 (C-7'''), 100.35 (C-1'''), 97.48 (C-1'), 80.71 (C-4'), 78.80 (C-2), 76.46 (C-3'), 76.25 (C-4'''), 75.66 (C-3), 73.43 (C-3'''), 72.78 (C-2'''), 70.72 (C-5'''), 71.28 (C-9'''), 70.99 (C-11'''), 69.42 (C-8'''), 69.10 (C-6'), 67.00 (C-10'''), 63.76 (C-5'), 62.28 (C-6'''), 61.17 (C-12'''), 55.61 (C-1), 52.54 (C-2'), 23.56, 21.39, 21.20, 21.13, 21.07, 20.97, 20.91, 20.85 (COCH_3) ppm.

Propargyl- α -D-glucopyranosid (Glc- α -Prop) (54)

Ansatz nach AAV 3d

Glucose: 5.0 g (27.7 mmol, 1 Äq.)

Propargylalkohol: 48 mL (831 mmol, 30 Äq.)

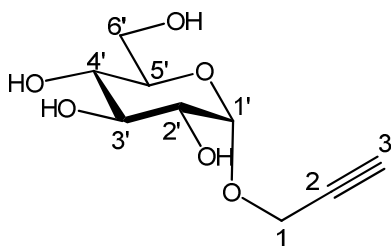
TMSCl: 35 mL (277 mmol, 10 Äq.)

Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie mit C/M (2:1) aufgereinigt.

β -Glucosidase: 50 mg

Phosphat-Puffer: 50 mL

Ausbeute: 2.17 g (36%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit C/M (2:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 5.05 (d, J = 3.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.29 (dd, J = 2.4, 6.7 Hz, 2H, 1-H), 3.81 (dd, J = 2.3, 12.3 Hz, 1H, 6'a-H), 3.72 (dd, J = 5.1, 12.3 Hz, 1H, 6'b-H), 3.68-3.63 (m, 2H, 5', 3'-H), 3.53 (dd, J = 3.8, 6.0 Hz, 1H, 2'-H), 3.39 (d, J = 9.9, 9.2 Hz, 1H, 4'-H), 2.85 (t, J = 2.4 Hz, 1H, 3-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 97.60 (C-1'), 79.41 (C-2), 76.36 (C-3), 73.36 (C-3'), 72.56 (C-5'), 71.38 (C-2'), 69.81 (C-4'), 60.75 (C-6'), 55.26 (C-1) ppm.

Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (55)

Ansatz nach AAV 3b

peracetylierter Glucosid (GlcAc₅) : 5.0 g (12.8 mmol, 1 Äq.)

Propargylalkohol: 1.12 mL (19.2 mmol, 1.5 Äq.)

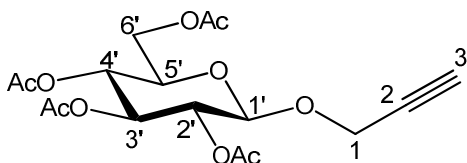
BF₃-Et₂O: 2.44 mL (19.2 mmol, 1.5 Äq.)

K₂CO₃: 1 g

DCM*: 25 mL

Ausbeute: 4.07 g (82%), als hellgelber Feststoff

R_f = 0.50 (EE/Cy, 1:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.24 (t, J = 9.5 Hz, 1H, 3'-H), 5.10 (t, J = 9.7 Hz, 1H, 4'-H), 5.01 (dd, J = 9.6, 8.0 Hz, 1H, 2'-H), 4.78 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.37 (d, J = 2.4 Hz, 2H, 1-H), 4.27 (dd, J = 12.3, 4.7 Hz, 1H, 6'a-H), 4.15 (dd, J = 12.3, 2.4 Hz, 1H, 6'b-H), 3.73 (ddd, J = 10.0, 4.6, 2.4 Hz, 1H, 5'-H), 2.48 (t, J = 2.4 Hz, 1H, 3-H), 2.09, 2.06, 2.02, 2.01 (s, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.58, 170.18, 169.37, 169.35 (COCH_3), 98.11 (C-1'), 78.09 (C-2), 75.48 (C-3), 72.75 (C-3'), 71.91 (C-5'), 70.95 (C-2'), 68.30 (C-4'), 61.75 (C-6'), 55.91 (C-1), 20.68, 20.65, 20.57, 20.56 (COCH_3) ppm.

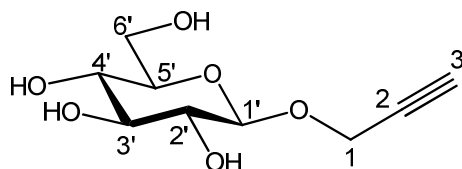
Propargyl- β -D-glucopyranosid (56)

Ansatz nach AAV 7

GlcAc $_4$ - β -Prop (55): 3.75 g (9.706 mmol, 1 Äq.)

Ausbeute: 2.01 g (95%), als hellbraunlicher Feststoff

R_f = 0.23 (C/M, 5:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 4.58 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.42 (d, J = 4.6 Hz, 2H, 1-H), 3.86 (dd, J = 12.4, 2.3 Hz, 1H, 6'a-H), 3.66 (dd, J = 12.4, 5.9 Hz, 1H, 6'b-H), 3.48 – 3.39 (m, 2H, 3'-, 5'-H), 3.33 (dd, J = 9.8, 9.1 Hz, 1H, 4'-H), 3.29 (s, 1H, 3-H), 3.24 (dd, J = 9.4, 8.0 Hz, 1H, 2'-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 100.57 (C-1'), 78.39 (C-2), 76.41 (C-3), 76.01 (C-3'), 75.73 (C-5'), 72.91 (C-2'), 69.58 (C-4'), 60.70 (C-6'), 56.55 (C-1) ppm.

Propargyl- α -D-galacotopyranosid (57)

Ansatz nach AAV 3d

Galactose: 5.0 g (27.7 mmol, 1 Äq.)

Propargylalkohol: 48 mL (831 mmol, 30 Äq.)

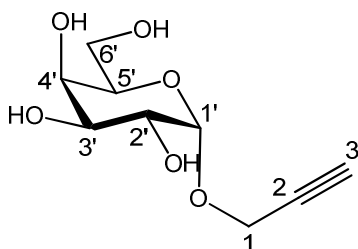
TMSCl: 35 mL (277 mmol, 10 Äq.)

Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie mit C/M (2:1) aufgereinigt.

β -Galactosidase: 50 mg

Phosphat-Puffer: 50 mL

Ausbeute: 2.54 g (42%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit C/M (2:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 5.05 (d, J = 3.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.32 (dd, J = 2.4, 1.2 Hz, 2H, 1-H), 3.92 (d, J = 3.2 Hz, 1H, 3'-H), 3.86 – 3.79 (m, 2H, 2'-, 5'-H), 3.78 – 3.67 (m, 3H, 4'-, 6'-H), 2.86 (t, J = 2.4 Hz, 1H, 3-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 99.21 (C-1'), 80.54 (C-2), 76.42 (C-3), 73.20 (C-5'), 71.81 (C-4'), 71.43 (C-3'), 70.37 (C-2'), 63.06 (C-6'), 55.68 (C-1) ppm.

Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galacotopyranosid (58)

Ansatz nach AAV 3b

GalAc₅: 2 g (5.115 mmol, 1 Äq.)

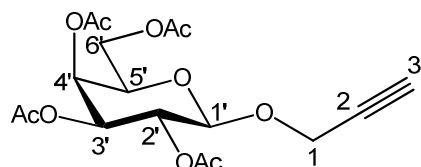
Propargylalkohol: 0.636 mL (10.23 mmol, 1.2 Äq.)

BF₃-Et₂O: 0.95 mL (7.673 mmol, 1.5 Äq.)

K₂CO₃: 1 g

DCM: 40 mL

Ausbeute: 1.6 g (82%), als farbloser Feststoff



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.33 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, 4'-H), 5.15 (dd, *J* = 10.4, 8.0 Hz, 1H, 2'-H), 4.99 (dd, *J* = 10.4, 3.4 Hz, 1H, 3'-H), 4.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.32 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, 1-H), 4.17 – 3.99 (m, 2H, 6'-H), 3.87 (dd, *J* = 7.8, 6.7 Hz, 1H, 5'-H), 2.40 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, 3-H), 2.08, 2.00, 1.99, 1.92 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.75, 170.59, 170.48, 169.92 (COCH₃), 99.05 (C-1'), 78.58 (C-2), 75.74 (C-3), 71.24 (C-5'), 71.22 (C-4'), 68.89 (C-3'), 67.37 (C-2'), 61.58 (C-6'), 56.27 (C-1), 21.15, 21.01, 20.93 (COCH₃) ppm.

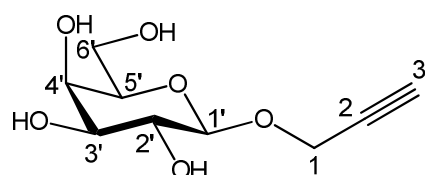
Propargyl-β-D-galacotopyranosid (59)

Ansatz nach AAV 7

GalAc₄-β-Prop (58): 1.0 g (2.588 mmol, 1 Äq.)

Ausbeute: 0.52 g (92%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.71 (C/M, 1:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 4.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 1'-H), 4.48 – 4.36 (m, 2H, 1-H), 3.87 (dd, $J = 3.5, 0.8$ Hz, 1H, 4'-H), 3.71 (q, $J = 11.7, 6.1$ Hz, 2H, 6'-H), 3.65 (ddd, $J = 7.8, 4.3, 0.9$ Hz, 1H, 5'-H), 3.61 (dd, $J = 9.9, 3.5$ Hz, 1H, 3'-H), 3.48 (dd, $J = 9.9, 7.9$ Hz, 1H, 2'-H), 2.87 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, 3-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 101.13$ (C-1'), 78.95 (C-2), 76.24 (C-3), 75.27 (C-5'), 72.75 (C-3'), 70.55 (C-2'), 68.60 (C-4'), 60.95 (C-6'), 56.50 (C-1) ppm.

Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (60)

Ansatz nach AAV 3b

LacAc₈: 1.0 g (1.47 mmol, 1 Äq.)

Propargylalkohol: 103 μL (1.77 mmol, 1.2 Äq.)

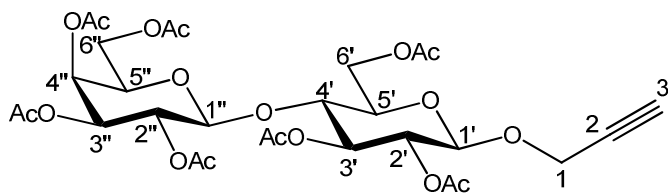
$\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$: 273 μL (2.20 mmol, 1.5 Äq.)

K_2CO_3 : 0.5 g

DCM*: 20 mL

Ausbeute: 0.744 g (75%), als farbloser Schaum nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit EE/Cy (1:1)

$R_f = 0.42$ (EE/Cy, 1:2), $R_f = 0.92$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/ H_2O , 35:35:7:23)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.28$ (dd, $J = 3.4, 1.0$ Hz, 1H, 4''-H), 5.16 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, 3'-H), 5.04 (dd, $J = 10.4, 7.9$ Hz, 1H, 2''-H), 4.89 (dd, $J = 10.4, 3.5$ Hz, 1H, 3''-H), 4.85 (dd, $J = 9.5, 7.9$ Hz, 1H, 2'-H), 4.68 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 1'-H), 4.46 – 4.40 (m, 2H, 1''-H, 6'-a-H), 4.27 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, 1-H), 4.11 – 3.97 (m, 3H, 6''-H, 6'-b-H), 3.81 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, 5''-H), 3.75 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, 4'-H), 3.57 (ddd, $J = 9.9, 4.9, 2.1$ Hz, 1H, 5'-H), 2.39 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, 3-H), 2.08, 2.05, 1.99, 1.98, 1.90 (s, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.72, 170.52, 170.43, 170.14, 170.10, 169.43 (COCH_3), 101.39 (C-1''), 98.28 (C-1'), 78.44 (C-2), 76.49 (C-4'), 75.84 (C-3), 73.15 (C-5'), 73.08 (C-3'), 71.70 (C-2'), 71.36 (C-5''), 71.10 (C-3''), 69.50 (C-2''), 67.02 (C-4''), 62.21 (C-6'), 61.22 (C-6''), 56.25 (C-1), 21.21, 21.16, 21.08, 21.00, 20.87 (COCH_3) ppm.

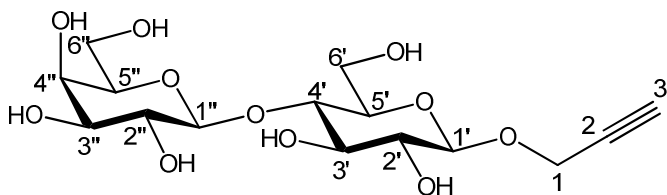
Propargyl-galactopyranosyl-(1→4)- β -D-glucopyranosid (61)

Ansatz nach AAV 7

LacAc₇-Prop (60): 1.5 g (2.224 mmol, 1 Äq.)

Ausbeute: 0.75 g (89%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.46 (C/M, 1:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 4.62 (d, J = 8.0 Hz, 1'H), 4.43 (dd, J = 4.8, 2.4 Hz, 2H, 1-H), 4.40 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 3.94 (dd, J = 12.3, 2.0 Hz, 1H, 6'a-H), 3.88 (d, J = 3.3 Hz, 1H, 4'-H), 3.77 (dd, J = 10.9, 3.6 Hz, 1H, 6'b-H), 3.74 – 3.71 (m, 2H, 6''-H), 3.70 – 3.66 (m, 1H, 5''-H), 3.65 – 3.59 (m, 3H, 3'-, 3''-, 4'-H), 3.57 (ddd, J = 9.7, 5.0, 2.3 Hz, 1H, 5'-H), 3.50 (dd, J = 9.9, 7.8 Hz, 1H, 2''-H), 3.34 – 3.26 (m, 1H, 2'-H), 2.89 (t, J = 2.4 Hz, 1H, 3-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 102.95 (C-1''), 100.42 (C-1'), 78.80 (C-2), 78.31 (C-3'), 76.38 (C-3), 75.37 (C-5''), 74.87 (C-5'), 74.37 (C-4'), 72.62 (C-2'), 72.55 (C-3''), 70.97 (C-2''), 68.57 (C-4''), 61.04 (C-6''), 60.04 (C-6'), 56.62 (C-1) ppm.

Methyl-(2-(1-hydroxyethyl)-1,2,3-triazol)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (62)

Ansatz nach AAV 8

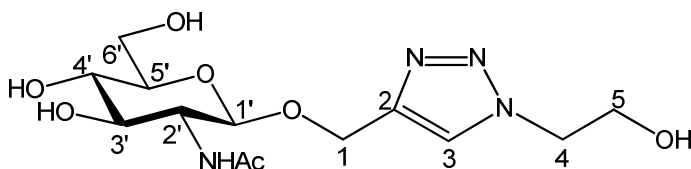
GlcNAc- β -prop (45): 300 mg (1.157 mmol, 1 Äq.) in 6 mL t BuOH/H₂O (1:1)

2-Azido-ethanol: 151 mg (1.736 mmol, 1.5 Äq.) in 6 mL t BuOH/H₂O (1:1)

CuSO₄·5H₂O: 289 mg (1.157 mmol, 1 Äq.) in 6 mL H₂O

Na-Ascorbat: 229 mg (1.157 mmol, 1 Äq.) in 6 mL H₂O

Ausbeute: 0.304 mg (76%), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit C/M (1:1)



^1H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.92 (s, 1H, 3-H), 4.81 (dd, J = 16.0, 9.3 Hz, 1H, 1a-H), 4.68 (m, 1H, 1b-H), 4.47 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 1'-H), 4.46 – 4.42 (m, 2H, 4-H), 3.88 (dd, J = 6.6, 3.7 Hz, 2H, 5-H), 3.81 (dd, J = 12.3, 1.7 Hz, 1H, 6'a-H), 3.64 (dd, J = 12.3, 5.4 Hz, 1H, 5'-H), 3.54 (dd, J = 10.3, 8.5 Hz, 1H, 2'-H), 3.39 (dt, J = 16.6, 8.2 Hz, 1'H), 3.35 – 3.28 (m, 2H, 4'-, 6'b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 174.07 (NHCOCH₃), 143.56 (C-2), 125.46 (C-3), 100.03 (C-1'), 75.96 (C-5'), 73.68 (C-3'), 69.93 (C-4'), 61.71 (C-6'), 60.74 (C-1), 60.01 (C-5), 55.50 (C-2'), 52.44 (C-4), 21.92 (NHCOCH₃) ppm.

Methyl-(2-(1-hydroxyethyl)-1,2,3-triazol)- β -D-galactopyranosid (63)

Ansatz nach AAV 8

Gal- β -prop (59): 1.0 g (4.58 mmol, 1 Äq.) in 10 mL t BuOH/H₂O (1:1)

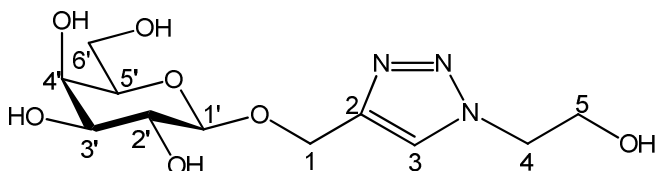
2-Azido-ethanol: 598 mg (6.87 mmol, 1.5 Äq.) in 10 mL t BuOH/H₂O (1:1)

CuSO₄·5H₂O: 572 mg (2.29 mmol, 0.5 Äq.) in 5 mL H₂O

Na-Ascorbat: 454 mg (2.29 mmol, 0.5 Äq.) in 5 mL H₂O

Ausbeute: 1.24 g (81%), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit C/M (2:1)

$R_f = 0.39$ (C/M, 1:1)



¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.06 (s, 1H, 3-H), 4.99 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 1a-H), 4.82 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 1b-H), 4.51 (t, J = 5.09 Hz, 2H, 4-H), 4.37 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 1'-H), 3.95 (t, J = 5.65 Hz, 2H, 5-H), 3.86 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 4'-H), 3.82 (dd, J = 11.4, 7.0 Hz, 1H, 6'a-H), 3.75 (dd, J = 11.4, 5.0 Hz, 1H, 6'b-H), 3.57 (dd, J = 11.0, 6.3 Hz, 2H, 5'-, 2'-H), 3.49 (dd, J = 9.7, 3.3 Hz, 1H, 3'-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 146.03 (C-2), 126.46 (C-3), 104.59 (C-1'), 77.23 (C-5'), 75.32 (C-3'), 72.88 (C-2'), 70.75 (C-4'), 63.41 (C-1), 63.02 (C-6'), 62.02 (C-5), 54.30 (C-4) ppm.

Methyl-(2-(1-Hydroxyethyl)-1,2,3-triazol)-galactopranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosid (64)

Ansatz nach AAV 8

Lac-β-prop (61): 1.0 g (2.63 mmol, 1 Äq.) in 10 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

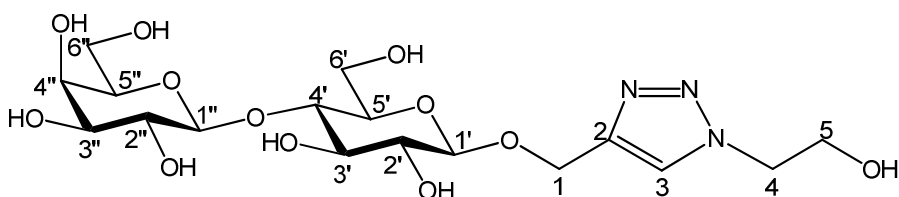
2-Azido-ethanol: 343 mg (3.94 mmol, 1.5 Äq.) in 10 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

CuSO₄·5H₂O: 328 mg (1.31 mmol, 0.5 Äq.) in 5 mL H₂O

Na-Ascorbat: 261 mg (1.31 mmol, 0.5 Äq.) in 5 mL H₂O

Ausbeute: 571 mg (46%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit C/M (1:1)

$R_f = 0.22$ (C/M, 1:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = 8.05$ (s, 1H, 3-H), 4.95 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, 1a-H), 4.84 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, 1b-H), 4.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1'-H), 4.51 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, 5-H), 4.39 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 1''-H), 3.97 – 3.90 (m, 3H, 4-, 6''-a-H), 3.87 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, 4''-H), 3.79 – 3.72 (m, 2H, 6'-H), 3.68 (ddd, $J = 11.9, 8.2, 4.0$ Hz, 1H, 5'-H), 3.64 – 3.53 (m, 5H, 6''-, 4'-, 3'-, 5''-H), 3.49 (dd, $J = 9.9, 7.8$ Hz, 1H, 2''-H), 3.29 (dd, $J = 9.8, 7.2$ Hz, 1H, 2'-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 143.88$ (C-2), 126.17 (C-3), 103.34 (C-1'''), 101.64 (C-1'), 78.74 (C-3'), 75.75 (C-5'), 75.22 (C-4'), 74.75 (C-5'-'), 73.12 (C-2'), 72.94 (C-3'-'), 71.36 (C-2'-'), 68.96 (C-4'-'), 62.38 (C-1), 61.42 (C-6'), 60.51 (C-6'', -4), 52.94 (C-5) ppm.

Azido-2-Acetamido-3,4,5-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (65)

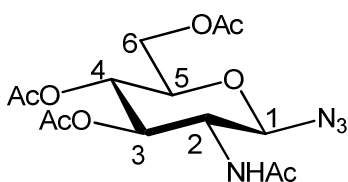
Ansatz nach AAV 4

NaN_3 : 0.462 g (7.11 mmol, 1.3 Äq.) in 5.5 mL H_2O

GlcNAcAc₃-Cl (42): 2.0 g (5.47 mmol, 1 Äq.) in 22 mL Aceton

Ausbeute: 1.49 g (73%), als hellgelber Feststoff nach Umkristallisieren in EtOH

$R_f = 0.32$ (Cy/EE, 1:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.98 (d, J = 8.9 Hz, 1H, NH), 5.21 (dd, J = 10.5, 9.4 Hz, 1H, 3-H), 5.03 (t, J = 9.7 Hz, 1H, 4-H), 4.74 (d, J = 9.3 Hz, 1H, 1-H), 4.21 (dd, J = 12.4, 4.9 Hz, 1H, 6a-H), 4.11 (dd, J = 12.4, 2.3 Hz, 1H, 6b-H), 3.86 (dt, J = 10.5, 9.1 Hz, 1H, 2-H), 3.76 (ddd, J = 10.1, 4.9, 2.3 Hz, 1H, 5-H), 2.04 (s, 3H, NHCOCH_3), 1.98, 1.97, 1.92 (s, 9H, COCH_3) ppm.

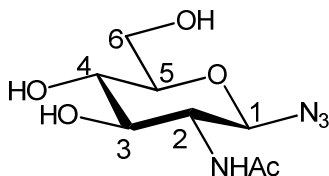
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 169.66, 169.45, 169.32, 168.06 (COCH_3), 87.15 (C-1), 72.69 (C-5), 70.94 (C-3), 66.97 (C-4), 60.68 (C-6), 52.89 (C-2), 21.96 (NHCOCH_3), 19.46, 19.38, 19.33 (COCH_3) ppm.

Azido-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (66)

Ansatz nach AAV 7

GlcNAcAc₃-N₃ (65): 1.0 g (2.68 mmol, 1 Äq.)

Ausbeute: 0.46 g (72%), als farbloser Feststoff



^1H -NMR (500 MHz, MeOD): δ = 4.42 (d, J = 9.3 Hz, 1H, 1-H), 3.80 (dd, J = 12.1, 1.9 Hz, 1H, 6a-H), 3.61 (dd, J = 12.0, 5.2 Hz, 1H, 6b-H), 3.57 (d, J = 9.5 Hz, 1H, 2-H), 3.37 (dd, J = 10.2, 8.3 Hz, 1H, 3-H), 3.30 – 3.18 (m, 2H, 5-, 4-H), 1.90 (s, 3H, NHCOCH_3) ppm.

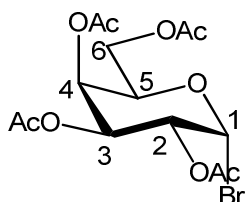
^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 174.24 (NHCOCH_3), 90.60 (C-1), 80.61 (C-5), 76.20 (C-3), 72.12 (C-4), 63.03 (C-6), 57.16 (C-2), 23.29 (NHCOCH_3) ppm.

Bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-galacpyranosid (68)

8.0 g (20.2 mmol, 1 Äq.) GalAc₅ werden in 26.7 mL (109.1 mmol, 5.4 Äq.) einer Lösung von HBr (33 wt% in Essigsäure) gelöst und für 2 h bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 300 mL CH₂Cl₂ verdünnt und unter Rühren in 500 mL Eiswasser gegeben. Die organische Phase wird abgetrennt, die wässrige Phase wird mit CH₂Cl₂ (3 x 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H₂O (3 x 250 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet.

Ausbeute: 7.9 g (95%), als hellgelber Feststoff

$R_f = 0.71$ (Cy/EE, 1:2)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 6.63 (t, J = 3.9 Hz, 1H, 1-H), 5.45 (d, J = 3.1 Hz, 1H, 4-H), 5.33 (dd, J = 3.4, 10.6 Hz, 1H, 3-H), 4.98 (dd, J = 3.9, 10.6 Hz, 1H, 2-H), 4.42 (t, J = 6.6, 1H, 5-H), 4.12 (dd, J = 3.9, 10.6 Hz, 1H, 2-H), 4.12 (dd, J = 6.4, 11.4 Hz, 1H, 6a-H), 4.04 (dd, J = 6.7, 11.4 Hz, 1H, 6b-H), 2.09, 2.05, 2.00, 1.95 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.73, 170.47, 170.30, 170.16 (COCH₃), 88.50 (C-1), 72.10 (C-5), 68.36 (C-2), 68.13 (C-3), 67.34 (C-4), 61.22 (C-6), 21.14, 21.04, 20.98, 20.95 (COCH₃) ppm.

Bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (69)

Ansatz I

8.25 mL Ätylbromid (111 mmol, 4 Äq.) wird unter Lichtausschluss in einer Mischung von 4.5 mL MeOH (111 mmol, 4 Äq.) und 75 mL AcOH gegeben und bis Beendigung der

Gasentwicklung (ca. 15 min) gerührt. Anschließend werden 8.01 g Laktose Monohydrat (22.22 mmol, 1 Äq.) und 27 mL Ac₂O (286 mmol, 13 Äq.) der Mischung zugegeben und für 24 h bei RT und unter Lichtausschluss bis zur vollständigen Umsetzung gerührt.

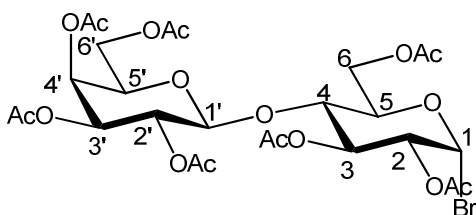
Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird das Rohprodukt (gelber bis oranger Sirup) in 36 mL Essigester in der Siedehitze gelöst, dann wird mit 28 mL Cyclohexan verdünnt. Nach einigen Stunden im Kühlschrank fällt das saubere Produkt (12.83 g, 82%) als leicht gelber oder farbloser Feststoff aus.

Ansatz II

In einer Lösung von 3.9 g (5.75 mmol, 1 Äq.) LacAc₈ werden 1.3 mL Acetylbromid und 0.3 mL MeOH* bei RT unter Dunkelheit zugegeben und kräftig gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung wird die Reaktionsmischung eingengt und der Rückstand wird in Cy/EE (1:1.3) auskristallisiert. Das Produkt wird mit kaltem Cyclohexan gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.775 g (95%), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.19$ (Cy/EE, 1:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 6.54 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 1-H), 5.57 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 3-H), 5.41 – 5.31 (m, 1H, 4'-H), 5.14 (dd, J = 10.4, 7.9 Hz, 1H, 2'-H), 4.98 (dd, J = 10.4, 3.5 Hz, 1H, 3'-H), 4.78 (dd, J = 10.0, 4.1 Hz, 1H, 2-H), 4.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.51 – 4.48 (m, 1H, 6a-H), 4.24 – 4.18 (m, 2H, 5-, 6b-H), 4.15 (dd, J = 11.3, 4.9 Hz, 1H, 6'-a-H), 4.13 – 4.07 (m, 1H, 6'-b-H), 3.93 – 3.86 (m, 2H, 5'-, 4-H), 2.17, 2.14, 2.10, 2.08, 2.07, 2.07, 1.98 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.32, 170.16, 170.12, 170.05, 169.95, 169.20, 168.94 (COCH₃), 100.79 (C-1'), 86.40 (C-1), 74.97 (C-4), 73.00 (C-5), 71.02 (C-3'), 70.88 (C-2),

70.82 (C-5'), 69.63 (C-3), 69.07 (C-2'), 66.65 (C-4'), 61.08 (C-6), 60.90 (C-6'), 26.90, 20.78, 20.64, 20.48 (COCH₃) ppm.

Azido-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (70)

Ansatz I

1.138 g (17.5 mmol, 3 Äq.) NaN₃ und 0.632 g t-BuNH₄·H₂SO₄ werden in eine Mischung von 2.4 g (5.84 mmol, 1 Äq.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylbromid (GlcAc₄-Br) in 13 mL DCM und 13 mL ges. NaHCO₃-Lösung zugegeben. Diese Mischung wird bei RT über Nacht gerührt, bis eine vollständige Umsetzung zu beobachten ist. Anschließend wird mit 30 mL EE verdünnt und mit 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung zweimal gewaschen. Die organische Phase wird mit H₂O (2 x 20 mL) und ges. NaCl-Lösung (2 x 20 mL) nacheinander gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird in Cy/EE umkristallisiert. Man erhält 0.709 g (33%) Produkt als farbloser Feststoff.

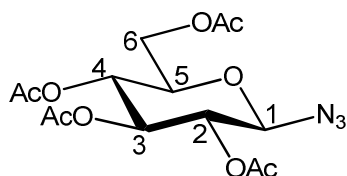
Ansatz II nach AAV 4

NaN₃: 0.412 g (6.34 mmol, 1.3 Äq.) in 5.5 mL H₂O

GlcAc₄-Br: 2.0 g (4.88 mmol, 1 Äq.) in 22 mL Aceton

Ausbeute: 1.44 g (79%), als farbloser Feststoff nach Umkristallisieren in EtOH

$R_f = 0.82$ (Cy/EE, 1:4)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.16 (t, J = 9.4 Hz, 1H, 3-H), 5.04 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 4-H), 4.89 (t, J = 8.9 Hz, 1H, 2-H), 4.58 (d, J = 8.8 Hz, 1H, 1-H), 4.21 (dd, J = 4.8, 12.5 Hz, 1H,

6a-H), 4.10 (d, $J = 12.4, 2.1$ Hz, 1H, 6b-H), 3.75 – 3.73 (m, 1H, 5-H), 2.05, 2.01, 1.96, 1.95 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.98, 170.49, 169.69, 169.58$ (COCH₃), 88.28 (C-1), 74.39 (C-5), 72.97 (C-3), 71.00 (C-2), 68.25 (C-4), 62.03 (C-6), 21.08, 20.92 (COCH₃) ppm.

Azido-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosid (71)

Ansatz I

2.325 g (35.8 mmol, 3 Äq.) NaN₃ und 1.291 g t-BuNH₄·H₂SO₄ werden in einer Mischung von 4.902 g (11.9 mmol, 1 Äq.) GalAc₄-Br (**68**) in 30 mL DCM und 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung zugegeben. Diese Mischung wird bei RT über Nacht gerührt bis eine vollständige Umsetzung zu beobachten ist. Anschließend wird mit 60 mL EE verdünnt und mit 50 mL ges. NaHCO₃-Lösung zweimal gewaschen. Die organische Phase wird mit H₂O (2 x 50 mL) und ges. NaCl-Lösung (2 x 50 mL) nacheinander gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abrotiert. Der Rückstand wird in EtOH umkristallisiert.

Ausbeute: 3.545 g (80%), als farbloser Feststoff

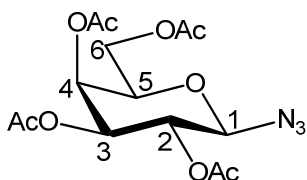
Ansatz II nach AAV 4

GalAc₄-Br: 10.127 g (24.63 mmol, 1 Äq.) in 88 mL Aceton

NaN₃: 1.940 g (29.56 mmol, 1.3 Äq.) in 30 mL H₂O

Ausbeute: 8.2 g (89%), als farbloser Feststoff nach Umkristallisieren in EtOH

$R_f = 0.72$ (Cy/EE, 1:4)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.35 (t, J = 9.4 Hz, 1H, 4-H), 5.09 (dd, J = 9.0, 10.4 Hz, 1H, 2-H), 4.97 (dd, J = 3.4, 10.3 Hz, 1H, 3-H), 4.53 (d, J = 8.8 Hz, 1H, 1-H), 4.11 – 4.07 (m, 2H, 6-H), 3.98 – 3.94 (m, 1H, 5-H), 2.10, 2.02, 1.97, 1.92 (s, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.71, 170.46, 170.34, 169.71 (COCH_3), 88.68 (C-1), 73.26 (C-5), 71.11 (C-3), 68.46 (C-2), 67.25 (C-4), 61.60 (C-6), 21.03, 20.97, 20.88 (COCH_3) ppm.

Azido-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (72)

Ansatz I

Nach Zugabe von 0.652 g (10 mmol, 3.5 Äq.) NaN_3 in eine Lösung von 2.0 g (2.859 mmol, 1 Äq.) $\text{LacAc}_7\text{-Br}$ (**69**) in 60 mL DMF wird die Reaktionsmischung bei 100 °C über Nacht gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird in EE gelöst und mit ges. NaHCO_3 -Lösung (3 x 80 mL) und mit ges. NaCl -Lösung (2 x 80 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Man erhält 1.52 g (80%) sauberes Produkt als hellgelben Schaum.

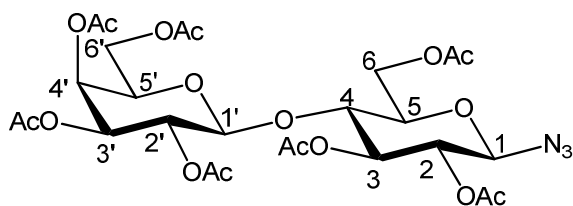
Ansatz II nach AAV 4

$\text{LacAc}_7\text{-Br}$ (**69**): 1.52 g (2.173 mmol, 1 Äq.) in 8 mL Aceton

NaN_3 : 0.212 g (3.259 mmol, 1.5 Äq.) in 2 mL H_2O

Ausbeute: 1.063 g (74%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE/Cy, 1:2)

R_f = 0.52 (Cy/EE, 1:2)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.28 (d, J = 3.3 Hz, 1H, 4'-H), 5.14 (t, J = 9.2 Hz, 1H, 3-H), 5.04 (dd, J = 10.4, 7.9 Hz, 1H, 2'-H), 4.89 (dd, J = 10.4, 3.4 Hz, 1H, 3'-H), 4.79 (t, J = 9.1 Hz, 1H, 2-H), 4.56 (d, J = 8.7 Hz, 1H, 1-H), 4.45 – 4.41 (m, 2H, 7-, 6a-H), 4.11 – 3.96 (m, 3H, 12-, 6b-H), 3.81 (t, J = 6.8 Hz, 1H, 5'-H), 3.75 (t, J = 9.4 Hz, 1H, 4-H), 3.67 – 3.59 (m, 1H, 5-H), 2.08, 2.07, 2.00, 1.98, 1.90 (s, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.67, 170.47, 170.40, 169.99, 169.85, 169.43 (COCH_3), 101.49 (C-7), 88.09 (C-1), 76.16 (C-4), 75.20 (C-5), 72.93 (C-3), 71.39 (C-2), 71.32 (C-5'), 71.16 (C-3'), 69.46 (C-2'), 66.98 (C-4'), 62.12 (C-6), 61.17 (C-6'), 21.17, 21.10, 21.00, 20.99, 20.86 (COCH_3) ppm.

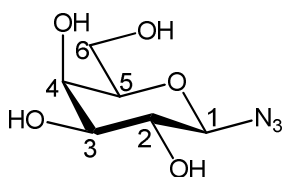
Azido- β -D-galacotopyranosid (73)

Ansatz nach AAV 7

GalAc₄-N₃ (71): 1.0 g (2.68 mmol, 1 Äq.)

Ausbeute: 0.436 g (79%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

R_f = 0.20 (C/M, 5:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 4.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H, 1-H), 3.88 (t, J = 1.8 Hz, 1H, 3-H), 3.79 – 3.78 (m, 1H, 6a-H), 3.76 – 3.75 (m, 1H, 6b-H), 3.64 – 3.64 (m, 1H, 5-H), 3.53 – 3.33 (m, 2H, 2-, 4-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 92.99 (C-1), 79.31 (C-5), 75.37 (C-4), 72.41 (C-2), 70.63 (C-3), 62.86 (C-6) ppm.

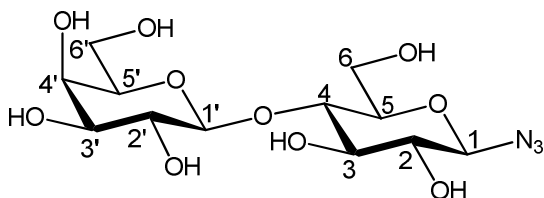
Azido-D-galactopyranosyl-(1→4)- β -D-glucopyranosid (74)

Ansatz nach AAV 7

LacAc₇-N₃ (72): 1.7 g (2.57 mmol, 1 Äq.)

Ausbeute: 0.813 g (86%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 2:1)

R_f = 0.47 (C/M, 1:1)



^1H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.71 (d, J = 8.8 Hz, 1H, 1-H), 4.39 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1'-H), 3.91 (d, 1H, 6a-H), 3.86 (d, J = 3.2 Hz, 1H, 4'-H), 3.74 (d, 1H, 6b-H), 3.73 – 3.59 (m, 7H, 6'-, 4-, 5-, 5'-, 3-, 3'-H), 3.48 (t, J = 1.8 Hz, 1H, 2'-H), 3.27 (t, J = 7.7 Hz, 1H, 2-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 101.23 (C-1'), 88.26 (C-1), 76.10 (C-5), 75.04 (C-5'), 73.70 (C-4), 72.70 (C-3), 70.86 (C-2, -3'), 69.29 (C-2'), 66.90 (C-4'), 59.38 (C-6'), 58.22 (C-6) ppm.

Amino-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (75)

Ansatz nach AAV 5a

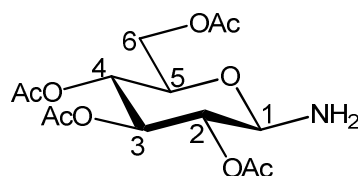
GlcAc₄- β -N₃ (70): 1.0 g (2.675 mmol)

Pd/C: 50 mg

THF*: 65 mL

Ausbeute: 0.92 g (99%), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.24$ (EE/Cy, 4:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.18 (t, J = 9.5 Hz, 1H, 3-H), 4.97 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 4-H), 4.76 (t, J = 9.3 Hz, 1H, 2-H), 4.17 (dd, J = 4.9, 12.3 Hz, 1H, 6a-H), 4.14 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 1-H), 4.04 (dd, J = 2.2, 12.3 Hz, 1H, 6b-H), 3.62 (ddd, J = 2.2, 4.8, 10.1 Hz, 1H, 5-H), 2.03, 1.99, 1.96, 1.94 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 171.08, 170.59, 169.94, 169.85 (COCH₃), 85.35 (C-1), 73.54 (C-3), 73.11 (C-5), 72.42 (C-2), 69.23 (C-4), 62.67 (C-6), 21.19, 21.16, 21.00 (COCH₃) ppm.

Amino-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosid (76)

Ansatz nach AAV 5a

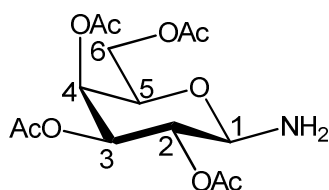
GalAc₄- β -N₃ (71): 2.0 g (5.357 mmol)

Pd/C: 100 mg

THF*: 150 mL

Ausbeute: 1.723 g (93%), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.24$ (EE/Cy, 4:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.33$ (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, 3-H), 5.00 – 4.94 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 1-H), 4.04 – 4.02 (m, 2H, 6-H), 3.83 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, 5-H), 2.08, 2.01, 1.97, 1.92 (s, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 169.46, 169.22, 169.08$ (COCH_3), 84.34 (C-1), 70.46 (C-5), 70.30 (C-3), 68.78 (C-2), 66.61 (C-4), 60.79 (C-6), 19.90, 19.72, 19.66, 19.59 (COCH_3) ppm.

Amino-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (77)

Ansatz nach AAV 5a

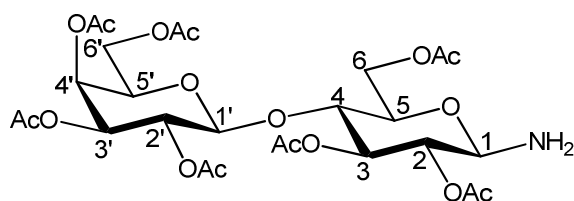
LacAc $_7$ - β -N $_3$ (72): 1.0 g (1.573 mmol)

Pd/C: 50 mg

THF*: 65 mL

Ausbeute: 1.0 g (99%), als farbloser Schaum

$R_f = 0.19$ (EE/Cy, 4:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.28 (d, J = 2.6 Hz, 1H, 4'-H), 5.16 (t, J = 9.4 Hz, 1H, 3-H), 5.04 (dd, J = 10.4, 7.9 Hz, 1H, 2'-H), 4.89 (dd, J = 10.3, 3.5 Hz, 1H, 3'-H), 4.66 (t, J = 9.2 Hz, 1H, 2-H), 4.41 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.40 – 4.38 (m, 1H, 6a-H), 4.09 (d, J = 8.9 Hz, 1H, 1-H), 4.07 – 4.02 (m, 3H, 12-, 6b-H), 3.80 (t, J = 7.0 Hz, 1H, 5'-H), 3.69 – 3.66 (m, 1H, 4-H), 3.51 (ddd, J = 2.0, 5.2, 9.9 Hz, 1H, 5-H), 2.08, 2.06, 2.00, 1.99, 1.98, 1.89 (s, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.83, 170.78, 170.70, 170.51, 170.42, 170.00, 169.42 (COCH_3), 101.45 (C-1'), 85.06 (C-1), 77.01 (C-4), 74.07 (C-5), 72.38 (C-3), 72.88 (C-2), 71.41 (C-3'), 71.07 (C-5'), 69.53 (C-2'), 67.03 (C-4'), 62.76 (C-6), 61.22 (C-6'), 21.26, 21.20, 21.00, 20.87 (COCH_3) ppm.

4-Oxo-4-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amino]-butansäure (78)

Ansatz nach AAV 6a

GlcAc₄-1-NH₂ (75): 0.2 g (0.576 mmol, 1 Äq.) in 15 mL DCM*

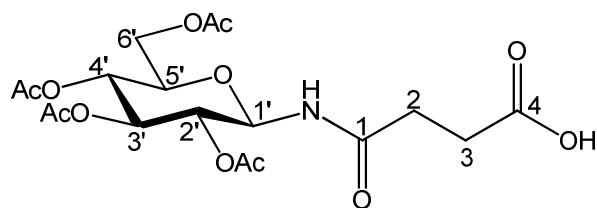
Bernsteinsäureanhydrid: 0.72 g (2.015 mmol, 3.5 Äq.)

Pyridin: 264 μL

DMAP: 3.5 mg (0.03 mmol, 0.05 Äq.)

Ausbeute: 0.219 g (85%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.15 (C/M, 10:1)



^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$: 11/1): δ = 5.23 – 5.18 (m, 2H, 3'-, 1'-H), 4.99 (t, J = 9.8 Hz, 1H, 4'-H), 4.87 (t, J = 9.5 Hz, 1H, 2'-H), 4.19 (dd, J = 4.4, 12.5 Hz, 1H, 6'a-H), 4.02

(dd, $J = 2.2, 12.4$ Hz, 1H, 6'-b-H), 3.75 (ddd, $J = 2.1, 4.3, 10.1$ Hz, 1H, 5'-H), 2.65 – 2.56 (m, 1H, 2a-H), 2.54 – 2.47 (m, 1H, 2b-H), 2.43 – 2.38 (m, 2H, 3-H), 2.00, 1.97, 1.96, 1.94 (s, 3H, COCH₃) ppm.

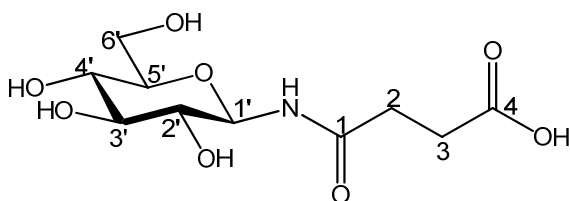
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃/MeOD: 11/1): $\delta = 174.88$ (C-4), 173.10, 171.32, 171.24, 170.45, 170.13 (COCH₃, NHCO), 78.30 (C-1'), 73.80 (C-3'), 73.39 (C-5'), 70.84 (C-2'), 68.54 (C-4'), 62.14 (C-6'), 31.11 (C-3), 29.12 (C-2), 20.93, 20.89, 20.82 (COCH₃) ppm.

4-Oxo-4-[(β -D-glucopyranosyl)-amino]-butansäure (79)

Ansatz nach AAV 7

GlcAc₄-Linker (78): 90 mg (0.201 mmol)

Ausbeute: 50 mg (90%), als hellgelber amorpher Feststoff



¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 4.84 - 4.79$ (m, 2H, NH, 1'-H), 3.77 (dd, $J = 2.1, 11.8$ Hz, 1H, 6'-a-H), 3.55 (dd, $J = 6.0, 11.8$ Hz, 1H, 6'-b-H), 3.36 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, 3'-H), 3.33 – 3.29 (m, 1H, 5'-H), 3.25 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H, 4'-H), 3.22 – 3.21 (m, 1H, 2'-H), 2.42 – 2.40 (m, 4H, 2-, 3-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 180.79$ (C-4), 177.72 (C-1), 81.67 (C-1'), 79.91 (C-5'), 78.87 (C-3'), 74.08 (C-4'), 71.89 (C-2'), 62.99 (C-6'), 33.68 (C-3), 33.58 (C-2) ppm.

5-Oxo-5-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amino]-pentansäure (80)

Ansatz nach AAV 6a

GlcAc₄-1-NH₂ (**75**): 0.2 g (0.576 mmol, 1 Äq.) in 15 mL DCM*

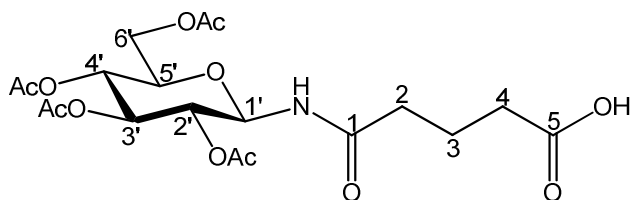
Glutarsäureanhydrid: 0.23 g (2.015 mmol, 3.5 Äq.)

Pyridin: 264 μ L

DMAP: 3.5 mg (0.03 mmol, 0.05 Äq.)

Ausbeute: 0.222 g (84%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 10:1)

$R_f = 0.18$ (C/M, 10:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 6.56 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NH), 5.23 – 5.20 (m, 2H, 3'-, 1'-H), 5.00 (t, J = 9.7 Hz, 1H, 4'-H), 4.87 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 2'-H), 4.20 (dd, J = 4.6, 12.5 Hz, 1H, 6'a-H), 4.03 (dd, J = 2.1, 12.5 Hz, 1H, 6'b-H), 3.76 (ddd, J = 2.2, 4.5, 10.1 Hz, 1H, 5'-H), 2.34 – 2.31 (m, 2H, 4-H), 2.29 – 2.20 (m, 2H, 2-H), 2.01, 1.98, 1.96, 1.95 (s, 3H, COCH₃), 1.89 – 1.86 (m, 2H, 3-H) ppm.

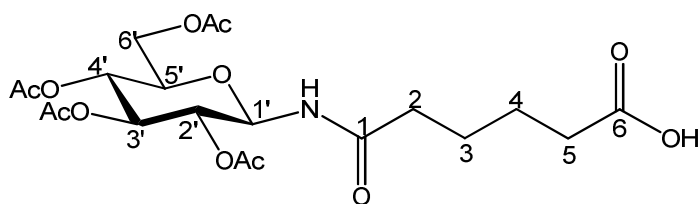
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 176.02 (C-5), 171.82 (C-1), 170.10, 169.72, 168.93, 168.63 (COCH₃), 77.02 (C-1'), 72.57 (C-5'), 71.87 (C-3'), 69.65 (C-2'), 67.21 (C-4'), 60.75 (C-6'), 34.04 (C-2), 31.56 (C-4), 19.71, 19.63, 19.56 (COCH₃), 18.99 (C-3) ppm.

6-Oxo-6-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amino]-hexansäure (**81**)

Eine Mischung aus 0.2 g (0.576 mmol, 1 Äq.) GlcAc₄-1-NH₂ (**75**), 168 mg (1.132 mmol, 2 Äq.) Adipinsäure, 35 mg (0.288 mmol, 0.5 Äq.) DMAP und 119 mg (0.576 mmol, 1 Äq.) DCC in 15 mL DCM* wird bei RT unter Argon als Schutzgas über Nacht gerührt, anschließend über eine Glasfritte abgesaugt und eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (1:4) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.237 g (87%), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.28$ (C/M, 10:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.46$ (s, 1H, NH), 5.32 – 5.26 (m, 2H, 3'-, 1'-H), 5.06 (td, $J = 2.2, 10.0$ Hz, 1H, 4'-H), 4.94 (td, $J = 1.5, 9.6$ Hz, 1H, 2'-H), 4.30 (ddd, $J = 1.9, 4.3, 12.4$ Hz, 1H, 6'a-H), 4.09 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, 6'b-H), 3.83 (dd, $J = 2.1, 10.1$ Hz, 1H, 5'-H), 2.39 – 2.36 (m, 2H, 5-H), 2.28 – 2.20 (m, 2H, 2-H), 2.08, 2.05, 2.04, 2.02 (d, $J = 2.2$ Hz, 3H, COCH_3), 1.66 – 1.65 (m, 4H, 4-, 3-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 178.27$ (C-6), 173.41 (C-1), 171.48, 171.06, 170.26, 170.00 (COCH_3), 78.49 (C-1'), 73.94 (C-5'), 73.14 (C-3'), 71.07 (C-2'), 68.58 (C-4'), 62.09 (C-6'), 36.39 (C-2), 33.79 (C-5), 24.74 (C-4), 24.38 (C-3), 21.09, 21.00, 20.94 (COCH_3) ppm.

10-Oxo-10-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amino]-decansäure (82)

Ansatz I

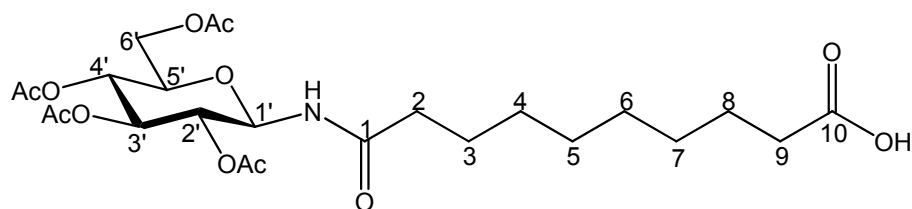
Eine Mischung aus 0.175 g (0.504 mmol, 1 Äq.) $\text{GlcAc}_4\text{-1-NH}_2$ (75), 204 mg (1.01 mmol, 2 Äq.) Sebacinsäure, 31 mg (0.252 mmol, 0.5 Äq.) DMAP und 104 mg (0.504 mmol, 1 Äq.) DCC in 18 mL DCM* wird bei RT unter Argon als Schutzgas für 5 h gerührt, anschließend über eine Fritte abgesaugt und eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (1:1) aufgereinigt. Man erhält 60 mg (23%) des sauberen Produkts als farblosen Feststoff.

Ansatz II

Eine Mischung aus 0.1 g (0.288 mmol, 1 Äq.) $\text{GlcAc}_4\text{-1-NH}_2$ (75), 138 mg (0.576 mmol, 2 Äq.) Sebacinsäuredichlorid, 16 mg (0.144 mmol, 0.5 Äq.) DMAP und 49 mg (0.288 mmol, 1 Äq.) AgNO_3 in 15 mL DCM* wird bei RT unter Argon als Schutzgas für 2 h gerührt, anschließend

abgesaugt und eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (1:1) aufgereinigt. Man erhält 46 mg (30%) farblosen Feststoff.

$R_f = 0.50$ (C/M, 5:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.21 - 5.17$ (m, 2H, 3'-, 1'-H), 4.98 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, 4'-H), 4.88 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, 2'-H), 4.18 (dd, $J = 4.6, 12.5$ Hz, 1H, 6'a-H), 4.03 (dd, $J = 2.1, 12.5$ Hz, 1H, 6'b-H), 3.79 – 3.75 (m, 1H, 5'-H), 2.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 9-H), 2.12 – 1.99 (m, 2H, 2-H), 2.00, 1.97, 1.96, 1.94 (s, 3H, COCH_3), 1.81 – 1.79 (m, 2H, 6-H), 1.65 – 1.60 (m, 2H, 7-H), 1.52 – 1.48 (m, 4H, 8-, 3-H), 1.27 – 1.25 (m, 2H, 4-H), 1.02 – 0.99 (m, 2H, 5-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 176.77$ (C-10), 174.98 (C-1), 171.33, 171.02, 170.50, 170.22 (COCH_3), 78.04 (C-1'), 73.67 (C-5'), 73.46 (C-3'), 70.91 (C-2'), 68.52 (C-4'), 62.13 (C-6'), 36.57 (C-2), 34.28 (C-9), 33.95 (C-6), 25.83 (C-5, -7), 25.47 (C-4), 25.06 (C-3, -8), 20.75, 20.71, 20.67 (COCH_3) ppm.

4-Oxo-4-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-amino]-butansäure (83)

Ansatz nach AAV 6a

GalAc₄-1-NH₂ (76): 0.6 g (1.727 mmol, 1 Äq.) in 25 mL DCM*

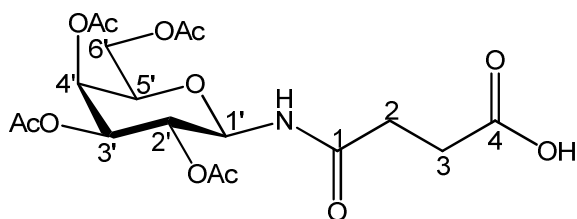
Bernsteinsäureanhydrid: 0.518 g (5.181 mmol, 3 Äq.) in 25 mL DCM*

Pyridin: 700 μL

DMAP: 11 mg (0.09 mmol, 0.05 Äq.)

Ausbeute: 0.53 g (69%), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.16$ (C/M, 10:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 6.44 (d, J = 4.4 Hz, 1H, NH), 5.36 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 4'-H), 5.18 (t, J = 9.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.08 – 5.02 (m, 2H, 3'-, 2'-H), 4.06 – 3.95 (m, 3H, 6'-, 5'-H), 2.65 – 2.71 (m, 1H, 2a-H), 2.59 – 2.53 (m, 1H, 2b-H), 2.44 – 2.41 (m, 2H, 3-H), 2.08, 1.99, 1.97, 1.92 (s, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 175.47 (C-4), 170.82, 170.54, 169.48, 169.07, 168.83 (COCH_3 , NHCO), 77.50 (C-1'), 71.31 (C-5'), 69.85 (C-3'), 67.34 (C-2'), 66.19 (C-4'), 60.13 (C-6'), 29.60 (C-3), 27.58 (C-2), 19.66, 19.57, 19.53 (COCH_3) ppm.

5-Oxo-5-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-amino]-pentansäure (84)

Ansatz nach AAV 6a

GalAc₄-1-NH₂ (76): 0.3 g (0.864 mmol, 1 Äq.) in 20 mL DCM*

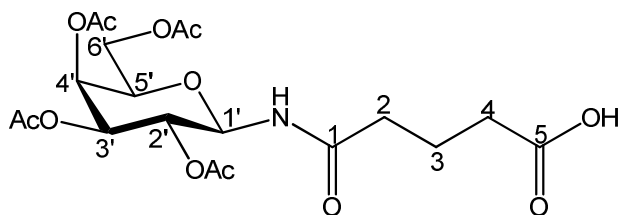
Glutarsäureanhydrid: 0.345 g (3.023 mmol, 3.5 Äq.) in 20 mL DCM*

Pyridin: 396 μL

DMAP: 5.2 mg (0.043 mmol, 0.05 Äq.)

Ausbeute: 0.139 g (35%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.20 (C/M, 10:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.32 (t, J = 3.2 Hz, 1H, 4'-H), 5.20 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 1'-H), 5.11 – 5.07 (m, 2H, 3'-, 2'-H), 4.09 – 3.96 (m, 3H, 5'-, 6'-a-, 6'-b-H), 2.20 – 2.15 (m, 4H, 4-, 2-H), 2.03, 1.92, 1.91, 1.85 (s, 3H, COCH_3), 1.78 – 1.75 (m, 2H, 3-H) ppm.

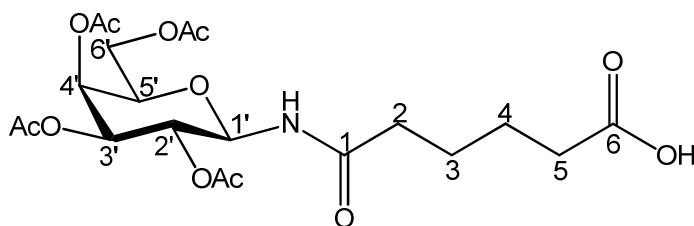
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 177.00 (C-5), 176.30 (C-1), 172.53, 172.31, 171.95, 171.82 (COCH_3), 79.54 (C-1'), 73.86 (C-5'), 73.38 (C-3'), 70.19 (C-2'), 69.39 (C-4'), 63.07 (C-6'), 36.41 (C-2), 34.29 (C-4), 22.30 (C-3), 21.00, 20.97, 20.92, 20.89 (COCH_3) ppm.

6-Oxo-6-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-amino]-hexansäure (85)

Eine Mischung aus 0.3 g (0.864 mmol, 1 Äq.) GalAc₄-1-NH₂ (76), 0.252 g (1.728 mmol, 2 Äq.) Adipinsäure, 5.2 mg (0.043 mmol, 0.05 Äq.) DMAP und 178 mg (0.864 mmol, 1 Äq.) DCC in 20 mL DCM* wird bei RT unter Argon als Schutzgas über Nacht gerührt, anschließend abgesaugt und eingengt. Der Rückstand wird in EE und Cy kristallisiert.

Ausbeute: 0.189 g (46%), als farbloser Feststoff.

R_f = 0.59 (C/M, 5:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.32 (d, J = 1.5 Hz, 1H, 4'-H), 5.17 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.07 – 5.06 (m, 2H, 3'-, 2'-H), 4.03 – 4.01 (m, 3H, 5'-, 6'-H), 2.22 (t, J = 7.0 Hz, 1H, 5-H), 2.16 (t, J = 7.0 Hz, 1H, 2-H), 2.06, 1.95, 1.90 (s, 3H, COCH_3), 1.55 – 1.50 (m, 4H, 3-, 4-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 177.44 (C-6), 176.55 (C-1), 172.71, 172.32, 172.04 (COCH_3), 79.71 (C-1'), 73.89 (C-5'), 73.35 (C-3'), 70.13 (C-2'), 69.25 (C-4'), 63.08 (C-6'), 37.40 (C-2), 35.27 (C-5), 27.28 (C-3, -4), 21.79, 21.74, 21.69 (COCH_3) ppm.

4-Oxo-4-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amino]-butansäure (86)

Ansatz nach AAV 6a

LacAc₇-1-NH₂ (77): 0.982 g (1.545 mmol, 1 Äq.) in 20 mL DCM*

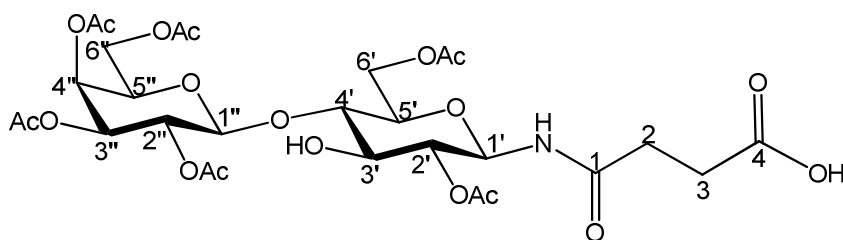
Bernsteinsäureanhydrid: 0.707 g (7.06 mmol, 4.6 Äq.) in 20 mL DCM*

Pyridin: 1.2 mL

DMAP: 15 mg (0.124 mmol, 0.08 Äq.)

Ausbeute: 0.716 g (63%), als farbloser Schaum nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE/Cy, 4:1)

$R_f = 0.12$ (C/M, 10:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 6.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.28 (d, J = 3.3 Hz, 1H, 4'-H), 5.22 (t, J = 9.1 Hz, 1H, 3'-H), 5.16 (t, J = 9.3 Hz, 1H, 1'-H), 5.01 (dd, J = 10.3, 8.0 Hz, 1H, 2''-H), 4.89 (dd, J = 10.4, 3.5 Hz, 1H, 3''-H), 4.78 (t, J = 9.5 Hz, 1H, 2'-H), 4.41 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1''-H), 4.38 – 4.32 (m, 1H, 6'a-H), 4.10 – 3.99 (m, 3H, 6''a-, 6'b-, 6''b-H), 3.81 (t, J = 7.1 Hz, 1H, 5''-H), 3.72 – 3.68 (m, 2H, 4'-, 5'-H), 2.70 – 2.64 (m, 1H, 2a-H), 2.60 – 2.54 (m, 1H, 2b-H), 2.43 – 3.99 (m, 2H, 3-H), 2.09, 2.05, 2.00, 1.98, 1.97, 1.90 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 176.63 (C-4), 172.28, 171.81, 170.88, 170.81, 170.55, 169.82, 169.48 (COCH₃, NHCO), 101.24 (C-1'), 78.37 (C-1'), 76.30 (C-4'), 74.88 (C-5'), 72.86 (C-3'), 71.39 (C-3'), 71.34 (C-2'), 71.08 (C-5'), 69.44 (C-2'), 67.04 (C-4'), 62.39 (C-6'), 61.24 (C-6'), 31.05 (C-3), 29.00 (C-2), 21.41, 21.24, 21.14, 21.01, 20.87 (COCH₃) ppm.

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-*N*'-(D-mannospyranoly)-butan-1,4-dicarbox-amid (87)**

Ansatz nach AAV 6b

GlcAc₄-Linker (78): 85 mg (0.190 mmol, 1 Äq.)

ManNH₂·HCl: 41 mg (0.190 mmol, 1 Äq.)

Et₃N: 26 μ L (0.190 mmol, 1 Äq.)

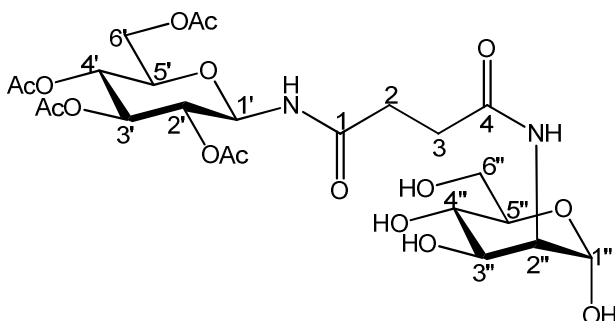
HOBt: 28.2 mg (0.209 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 28.8 mg (0.228 mmol, 1.2 Äq.)

DMF*: 5 mL

Ausbeute: 97 mg (84%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

R_f = 0.19 (C/M, 5:1)



¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 5.33 – 5.31 (m, 2H, 3'-, 1'-H), 5.06 (m, 1H, 4'-H), 5.03 (d, J = 1.4 Hz, 1H, 1''-H), 4.99 (t, J = 9.4 Hz, 1H, 2'-H), 4.31 – 4.26 (m, 2H, 2''-, 6'a-H), 4.11 (dd, J = 2.2, 12.4 Hz, 1H, 6'b-H), 3.99 (dd, J = 4.6, 9.7 Hz, 1H, 3''-H), 3.94 (dq, J = 2.3, 10.1 Hz, 1H, 5'-H), 3.87 (m, 1H, 6''a-H), 3.80 – 3.78 (m, 2H, 5''-, 6''b-H), 3.61 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 4''-H), 2.60 – 2.54 (m, 4H, 2-, 3-H), 2.05 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 6H, 2 x COCH₃), 1.99 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 175.79 (C-1), 175.51 (C-4), 172.74, 171.99, 171.87, 171.74 (COCH₃), 95.36 (C-1'), 79.34 (C-1''), 75.23 (C-3'), 75.05 (C-5'), 73.89 (C-5''), 72.46 (C-

2'), 71.27 (C-3'), 69.97 (C-4'), 68.99 (C-4'), 63.54 (C-6'), 62.66 (C-6'), 55.47 (C-2'), 32.59 (C-2), 31.93 (C-3), 21.04, 20.99 (COCH₃) ppm.

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-*N'*-(D-mannospyranoly)-hexan-1,6-dicarbox-amid (88)**

Ansatz nach AAV 6b

GlcAc₄-Linker (81): 100 mg (0.210 mmol, 1 Äq.)

ManNH₂·HCl: 45 mg (0.210 mmol, 1 Äq.)

Et₃N: 29.2 μL (0.210 mmol, 1 Äq.)

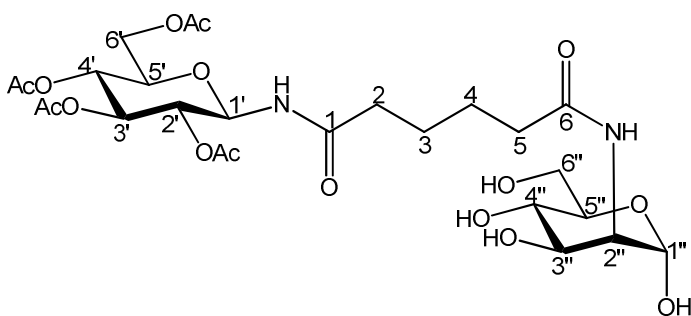
HOBt: 31.3 mg (0.231 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 31.8 mg (0.252 mmol, 1.2 Äq.)

DMF*: 8 mL

Ausbeute: 101 mg (76%), als farbloser Sirup nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

R_f = 0.21 (C/M, 5:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.20 – 5.18 (m, 2H, 3'-, 1'-H), 5.00 – 4.98 (m, 2H, 4'-, 1''-H), 4.91 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, 2'-H), 4.25 (dd, 1H, 2''-H), 4.19 (dd, *J* = 2.2, 12.4 Hz, 1H, 6'a-H), 4.04 – 4.00 (m, 2H, 6'b-, 3''-H), 3.76 – 3.69 (m, 4H, 6''a, 5'-, 5''-, 6''b-H), 3.54 (t, *J*

= 9.6 Hz, 1H, 4''-H), 2.18 – 2.14 (m, 4H, 5-, 2-H), 1.99, 1.96, 1.95, 1.93 (s, 3H, COCH₃), 1.57 – 1.52 (m, 4H, 4-, 3-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 176.44 (C-6), 175.82 (C-1), 172.32, 172.12, 171.48, 171.15 (COCH₃), 94.80 (C-1'), 78.99 (C-1'), 74.69 (C-3'), 74.52 (C-5'), 73.04 (C-5'), 71.93 (C-2'), 71.08 (C-3'), 69.45 (C-4'), 68.39 (C-4'), 63.10 (C-6'), 62.34 (C-6'), 54.78 (C-2'), 36.92 (C-5), 36.49 (C-2), 26.10 (C-4), 25.65 (C-3), 21.77, 21.70 (COCH₃) ppm.

N-(Hepta-*O*-acetyl-β-D-lactosyl)-*N'*-(D-mannospyranoly)-butan-1,4-dicarbox-amid (89)

Ansatz nach AAV 6b

LacAc₇-Linker (86): 60 mg (0.082 mmol, 1 Äq.)

ManNH₂·HCl: 18 mg (0.080 mmol, 1 Äq.)

Et₃N: 11 μL (0.080 mmol, 1 Äq.)

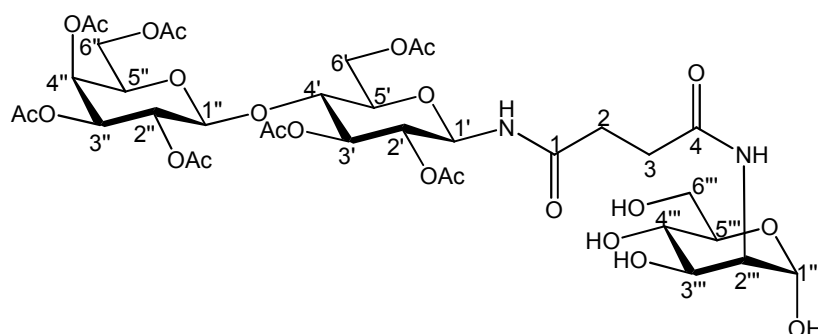
HOBt: 12 mg (0.088 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 28.8 mg (0.096 mmol, 1.2 Äq.)

DMF*: 5 mL

Ausbeute: 41 mg (56%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 8:1)

*R*_f = 0.35 (C/M, 5:1)



¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 5.27 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, 4''-H), 5.14 – 5.11 (m, 2H, 3'-, 1'-H), 4.96 – 4.94 (m, 3H, 2''-, 1''', 3''-H), 4.81 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, 2'-H), 4.51 (d, *J* = 7.4

Hz, 1H, 1''-H), 4.39 (dd, 1H, 6''a-H), 4.25 (dd, 1H, 2'''-H), 4.17 – 4.11 (m, 3H, 6'a-, 6'''a-, 6''b-H), 3.94 – 3.91 (m, 2H, 5'''-, 3'''-H), 3.78 – 3.68 (m, 5H, 5'-, 6'b-, 4'-, 6''b-, 5''-H), 3.50 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, 4'''-H), 2.49 – 2.40 (m, 4H, 2-, 3-H), 2.10, 2.07, 2.02, 2.00, 1.98, 1.95, 1.88 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 175.61$ (C-1), 175.52 (C-4), 172.84, 172.59, 172.40, 172.36, 172.14, 172.02, 171.45 (COCH₃), 102.3 (C-1'), 95.35 (C-1'''), 79.35 (C-1'), 77.66 (C-5'), 76.21 (C-5'), 75.22 (C-3'), 73.63 (C-4'), 72.92 (C-3'), 72.67 (C-2'), 72.27 (C-5'''), 71.50 (C-3'''), 71.06 (C-2'), 69.03 (C-4'''), 68.78 (C-4'), 64.01 (C-6'), 62.80 (C-6'''), 62.72 (C-6'), 55.39 (C-2'''), 32.73 (C-2), 32.17 (C-3), 22.19, 22.00, 21.90, 21.84, 21.80, 21.74 (COCH₃) ppm.

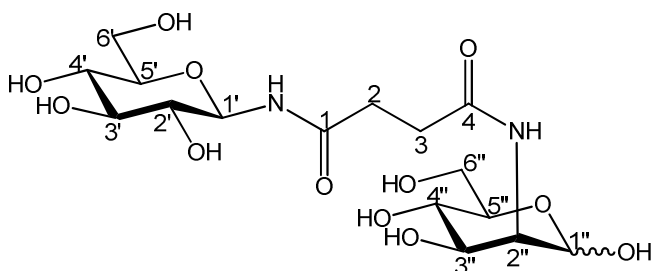
N-(β -D-glucopyranosyl)-*N*'-(D-mannospyranoly)-butan-1,4-dicarbox-amid (90)

Ansatz nach AAV 7

GlcAc₄-L4-ManN (87): 71 mg (0.117 mmol)

Zur Aufarbeitung wird das Rohprodukt in H₂O gelöst und mit DCM und EE je zweimal gewaschen. Die wässrige Phase wird lyophilisiert.

Ausbeute: 51 mg (98%), als farbloser Feststoff; $\alpha/\beta = 2:1$



¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 4.95$ (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 1'α-H), 4.82 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, 1'β-H), 4.79 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, 1'-H), 4.33 (dd, $J = 1.5, 4.3$ Hz, 1H, 2'β-H), 4.19 (dd, $J = 1.5, 4.6$ Hz, 1H, 2'α-H), 3.89 (dd, $J = 4.6, 9.7$ Hz, 1H, 3'α-H), 3.75 – 3.67 (m, 4H, 6'α-, 6'''-, 5''-H), 3.62 (dd, 1H, 3'β-H), 3.56 (dd, $J = 5.4, 12.2$ Hz, 1H, 6'β-H), 3.51 (t, $J = 9.6$

Hz, 1H, 4'-' α -H), 3.42 – 3.35 (m, 2H, 4'-' β -, 3'-H), 3.32 (m, 1H, 5'-H), 3.26 – 3.23 (m, 2H, 4'-, 2'-H), 2.53 – 2.49 (m, 4H, 3-, 2-H) ppm.

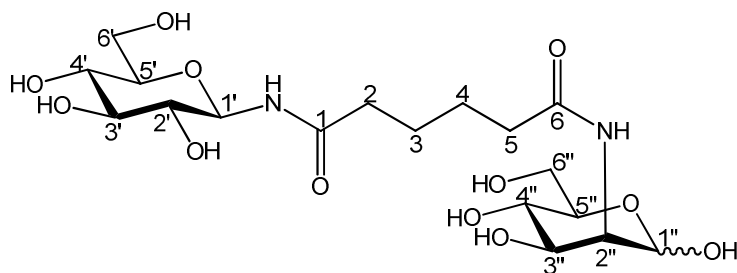
^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 177.23 (C-1), 176.56 (C-4), 95.14 (C-1'-' α), 81.34 (C-1'), 79.66 (C-5'), 78.73 (C-3'), 73.99 (C-5'-' α), 73.95 (C-2'), 71.43 (C-4'), 70.99 (C-3'-' α), 68.76 (C-4'-' α), 62.72 (C-6'), 62.42 (C-6'-' α), 55.27 (C-2'-' α), 32.74 (C-2), 32.28 (C-3) ppm.

N-(β -D-glucopyranosyl)-*N'*-(D-mannospyranoly)-hexan-1,6-dicarbox-amid (91)

Ansatz nach AAV 7

GlcAc₄-L6-ManN (88): 78 mg (0.117 mmol)

Ausbeute: 43 mg (79%), als farbloser Feststoff; α/β = 3:1



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 4.84 (d, J = 1.3 Hz, 1H, 1'-' α -H), 4.72 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.11 (dd, J = 1.3, 4.6 Hz, 1H, 2'-' α -H), 3.86 (dd, J = 4.6, 9.7 Hz, 1H, 3'-' α -H), 3.68 – 3.61 (m, 4H, 6'-' α -, 6'-' β -, 5'-' β -H), 3.50 (dd, J = 5.4, 12.2 Hz, 1H, 6'-' β -H), 3.48 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 4'-' α -H), 3.24 (t, 1H, 3'-H), 3.19 – 3.11 (m, 3H, 5'-, 4'-, 2'-H), 3.14 – 3.10 (m, 4H, 2-, 5-H), 1.55 – 1.49 (m, 4H, 3-, 4-H) ppm.

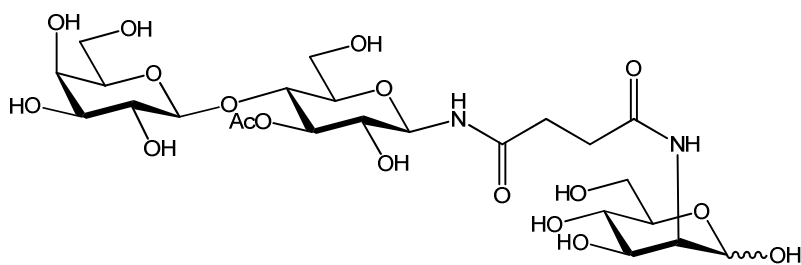
^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 177.51 (C-1), 177.06 (C-6), 95.40 (C-1'-' α), 81.52 (C-1'), 79.31 (C-5'), 79.31 (C-3'), 74.25 (C-2'), 73.92 (C-5'-' α), 71.88 (C-4'), 71.21 (C-3'-' α), 68.93 (C-4'-' α), 63.12 (C-6'), 62.63 (C-6'-' α), 55.42 (C-2'-' α), 37.15 (C-2), 36.81 (C-5), 26.72 (C-3), 26.37 (C-4) ppm.

***N*-(β-D-Lactosyl)-*N*'-(D-mannospyranoly)-butan-1,4-dicarbox-amid (92)**

Ansatz nach AAV 7

LacAc₇-L4-ManN (**89**): 41 mg (0.046 mmol)

Ausbeute: 19 mg (69%), als farbloser Feststoff

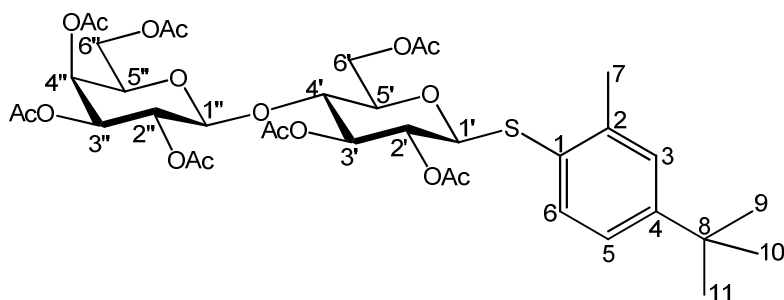


ESI-MS: C₂₂H₃₈N₂Na₁O₁₇ [M + Na]⁺, berechnet 625.2, gemessen 625.4

***S*-(4-Tertbutyl-2-methylphenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosid (93)**

Eine Mischung aus 2.012 g (2.96 mmol) LacAc₈, 0.8 mL 4-Tert-butyl-2-methylbenzenthiole und 1.6 mL BF₃·Et₂O in 15 mL DCM* bei RT unter Argon als Schutzgas gerührt, nach 4 h wird die Mischung mit 5 mL ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und mit H₂O (2 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (2:1) aufgereinigt. Man erhält 1.208 g (51%, bezogen auf LacAc₈) sauberes β-Produkt.

*R*_f = 0.41 (Cy/EE, 1:1)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.43 (d, 1H, J = 2.0 Hz, 3-H), 7.17 (dd, 1H, J = 2.0, 7.9 Hz, 5-H), 7.06 (d, 1H, J = 8.0 Hz, 6-H), 5.27 (t, 1H, J = 3.2 Hz, 4'-H), 5.15 (t, 1H, J = 9.2 Hz, 3'-H), 5.01 (dd, 1H, J = 7.9, 10.3 Hz, 2'-H), 4.91 (dd, 1H, J = 9.8 Hz, 2'-H), 4.88 (dd, 1H, J = 3.4, 10.4 Hz, 3'-H), 4.56 (d, 1H, J = 10.2 Hz, 1'-H), 4.40 (d, 1H, J = 7.9 Hz, 1'-H), 4.38 (dd, 1H, J = 1.9, 12.1 Hz, 6'a-H), 4.03 (m, 3H, 6'-, 6'b-H), 3.80 (t, 1H, J = 7.0 Hz, 5'-H), 3.74 (t, 1H, J = 9.6 Hz, 4'-H), 3.54 (ddd, 1H, J = 1.8, 5.2, 9.8 Hz, 5'-H), 2.28, 2.07, 2.02, 2.02, 1.97, 1.95, 1.88 (s, 3H, COCH_3), 1.24 (s, 9H, 9-, 10-, 11-H), 1.22 (s, 3H, 7-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 170.74, 170.74, 170.53, 170.44, 170.15, 169.96, 169.46 (COCH_3), 150.08 (C-4), 137.86 (C-2), 131.79 (C-1), 130.79 (C-3), 130.46 (C-6), 126.03 (C-5), 101.46 (C-1'), 87.18 (C-1'), 76.95 (C-5'), 76.52 (C-4'), 74.32 (C-3'), 71.38 (C-3'), 71.08 (C-2'), 70.90 (C-5'), 69.46 (C-2'), 66.98 (C-4'), 62.81 (C-6'), 61.20 (C-6'), 34.83 (C-8), 31.69 (C-9, -10, -11), 21.44 (C-7), 21.26, 21.20, 21.18, 21.03, 21.01, 20.89, 20.72 (COCH_3) ppm.

4-Pentenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosid (94)

Ansatz I

5 g Molsieb (4 Å) werden in eine Lösung von 0.64 g (7.3 mmol, 1 Äq.) 4-Penten-1-ol in 180 mL trockenem Toluol unter Stickstoff zugegeben. Nach 1-stündigem Rühren wird eine Lösung von $\text{GalAc}_4\text{-Br}$ (**68**) in 75 mL trockenem Toluol und 1.84 g (7.3 mmol, 1 Äq.) $\text{Hg}(\text{CN})_2$ zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 22 h bei 80 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird der Mischung abfiltriert und das Filtrat nacheinander mit einer NaHCO_3 -Lösung (5 wt%, 2 x 200 mL) und einer KI-Lösung (10 wt%, 2 x 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Cy/EE (1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 2.3 g (75%), als gelber Sirup.

Ansatz II

Einer Lösung von 1.0 g (2.4 mmol, 1 Äq.) GalAc₄-Br (**68**) in 5 mL trockenem Toluol werden unter N₂-Atmosphäre in einer Mischung aus 0.14 g (1.6 mmol, 0.66 Äq.) 4-Penten-1-ol in 45 mL trockenem Toluol und 0.42 g (2.4 mmol, 1 Äq.) CdCO₃ innerhalb 5 min zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 80 °C unter Schutzgas gerührt, bis kein weiterer Umsatz (ca. 116 h) zu beobachten ist, und dann filtriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Cy/EE (1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.33 g (49%), als gelber Sirup.

Ansatz III nach AAV 3a:

4-Penten-ol: 1.53 g (17.4 mmol, 6 Äq.)

GalAc₄-Br (**68**): 1.2 g (2.9 mmol, 1 Äq.)

Ag₂O: 400 mg (1.74 mmol, 0.6 Äq.)

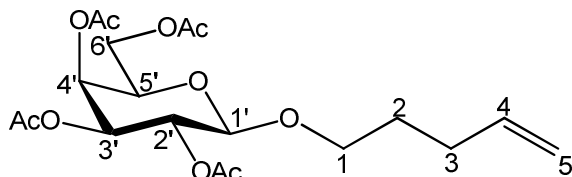
Iod: 14.5 mg (0.06 mmol, 0.02 Äq.)

Molsieb (4Å): 3 g

18 mL CHCl₃

Ausbeute: 0,59 g (49%), als gelber Sirup nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EE, 1:1)

R_f = 0.48 (Cy/EE, 1:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.83 – 5.75 (m, 1H, 4-H), 5.39 (dd, *J* = 0.8, 3.4 Hz, 1H, 4'-H), 5.21 (dd, *J* = 8.0, 10.5 Hz, 1H, 2'-H), 5.03 – 5.00 (m, 3H, 5a-, 3'-, 5b-H), 4.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.18 (dd, *J* = 6.5, 10.3 Hz, 1H, 6'-a-H), 4.14 – 4.11 (m, 1H, 6'-b-H), 3.92

– 3.88 (m, 2H, 5'-, 1a-H), 3.53 – 3.49 (m, 1H, 1b-H), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 2.13 – 2.07 (m, 2H, 3-H), 2.06, 2.05, 1.99 (s, 3H, COCH₃), 1.75 – 1.64 (m, 2H, 2-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.78, 170.66, 170.57, 169.75 (COCH₃), 138.20 (C-4), 115.44 (C-5), 101.74 (C-1'), 71.36 (C-3'), 70.98 (C-5'), 69.76 (C-1), 69.34 (C-2'), 67.48 (C-4'), 61.68 (C-6'), 30.20 (C-3), 28.99 (C-2), 21.40, 21.12, 21.04, 20.96 (COCH₃) ppm.

6-Hydroxyhexyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-*O*-β-D-galactopyranosid (95)

Ansatz nach AAV 3c

GalAc₄-1-NHCCl₃ (**49**): 1.6 g (2.15 mmol, 2 Äq.)

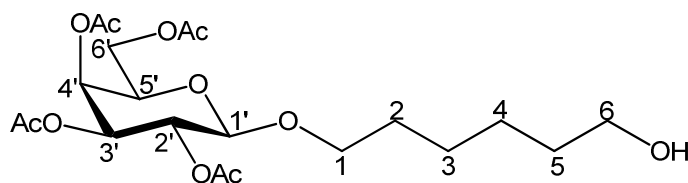
1,6-Hexandiol: 0.113 g (1.13 mmol, 1 Äq.)

AgOTf: 0.2 g (0.78 mmol, 0.7 Äq.)

DCM*: 42 mL

Ausbeute: 125 mg (25%), nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE/Cy, 2:1)

R_f = 0.12 (EE/Cy, 1:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.32 (dd, *J* = 1.0, 3.5 Hz, 1H, 4'-H), 5.12 (dd, *J* = 7.5, 10.5 Hz, 1H, 2'-H), 4.95 (dd, *J* = 3.5, 10.5 Hz, 1H, 3'-H), 4.38 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 1'-H), 4.10 (dd, *J* = 6.5, 10.3 Hz, 1H, 6'a-H), 4.07 (m, 1H, 6'b-H), 3.98 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 6-H), 3.84 – 3.80 (m, 2H, 1a-, 5'-H), 3.44 – 3.39 (m, 1H, 1b-H), 2.08, 1.98, 1.98 1.91 (s, 3H, COCH₃), 1.55 – 1.52 (m, 4H, 2-, 5-H), 1.30 – 1.28 (m, 4H, 3-, 4-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.76, 170.65, 170.56, 169.72 (COCH₃), 101.72 (C-1'), 71.34 (C-3'), 70.98 (C-5'), 70.39 (C-1), 69.32 (C-2'), 67.46 (C-4'), 64.78 (C-6), 61.65 (C-

6'), 29.69 (C-2), 28.92 (C-5), 26.02 (C-4), 25.88 (C-3), 21.35, 21.10, 21.03, 20.96 (COCH₃) ppm.

8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-β-D-galactopyranosyl)-octanol (96)

Ansatz nach AAV 3c

GalAc₄-1-NHCCl₃ (49): 1.01 g (2.05 mmol, 2 Äq.)

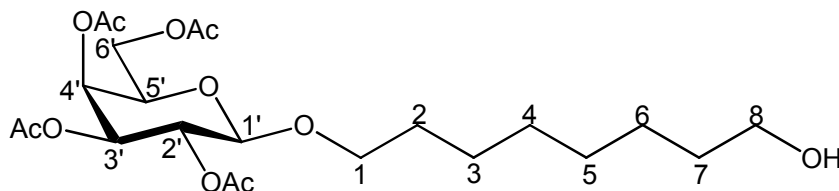
1,8-Octandiol: 0.155 g (1.08 mmol, 1 Äq.)

AgOTf: 0.24 g (0.78 mmol, 0.7 Äq.)

DCM*: 39 mL

Ausbeute: 180 mg (35%), nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE/Cy, 2:1)

R_f = 0.33 (EE/Cy, 1:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.32 (dd, *J* = 1.0, 3.5 Hz, 1H, 4'-H), 5.12 (dd, *J* = 8.0, 10.5 Hz, 1H, 2'-H), 4.95 (dd, *J* = 3.5, 10.5 Hz, 1H, 3'-H), 4.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.10 (dd, *J* = 6.5, 10.3 Hz, 1H, 6'a-H), 4.06 (m, 1H, 6'b-H), 3.98 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, 6-H), 3.84 – 3.80 (m, 2H, 1a-, 5'-H), 3.44 – 3.39 (m, 1H, 1b-H), 2.08, 1.98, 1.98 1.92 (s, 3H, COCH₃), 1.55 – 1.49 (m, 4H, 2-, 7-H), 1.29 – 1.20 (m, 10H, 3-, 7-, 4-, 6-, 5-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.83, 170.71, 170.63, 169.78 (COCH₃), 101.74 (C-1'), 71.37 (C-3'), 70.89 (C-5'), 70.62 (C-1), 69.36 (C-2'), 67.49 (C-4'), 64.97 (C-6), 61.68 (C-6'), 29.76 (C-7), 29.56 (C-2, -4), 28.96 (C-5), 26.22 (C-3), 26.11 (C-6), 21.39, 21.13, 21.05, 20.98 (COCH₃) ppm.

5-Hydroxypentyl-2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (97)

Ansatz nach AAV 3a

1,5-Pentandiol: 1.485 g (14.3 mmol, 10 Äq.)

LacAc₇-Br (**69**): 1.0 g (1.43 mmol, 1 Äq.)

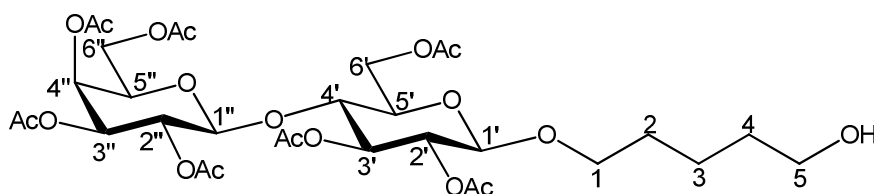
Ag₂O: 855 mg (3.7 mmol, 2.6 Äq.)

Iod: katalytische Menge

18 mL CHCl₃

Ausbeute: 0.469 g (46%), als farbloser Sirup nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EE, 1:1)

$R_f = 0.38$ (Cy/EE, 1:10)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.33 (dd, J = 0.8, 3.4 Hz, 1H, 4'''-H), 5.18 (t, J = 9.3 Hz, 1H, 3'-H), 5.09 (dd, J = 7.9, 10.0 Hz, 1H, 2'''-H), 4.94 (dd, J = 10.0, 3.4 Hz, 1H, 3'''-H), 4.87 (dd, J = 7.9, 9.5 Hz, 1H, 2'-H), 4.49 (m, 1H, 6'a-H), 4.48 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'''-H), 4.44 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.10 (m, 3H, 6''a-, 6''b-, 6''b'-H), 3.86 (m, 1H, 5'''-H), 3.82 (m, 1H, 1a-H), 3.78 (t, J = 9.3 Hz, 1H, 4'-H), 3.62 (m, 3H, 5-, 5'-H), 3.47 (m, 1H, 1b-H), 2.14, 2.11, 2.05, 2.03, 2.00, 1.95 (s, 3H, COCH₃), 1.56 (m, 4H, 4-, 2-H), 1.46 (m, 2H, 3-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.4, 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 169.6, 169.0 (COCH₃), 101.0 (C-1'), 100.6 (C-1''), 76.3 (C-4'), 73.2 (C-3'), 72.6 (C-5'), 71.7 (C-2'), 71.0 (C-3''), 70.7 (C-5''), 69.9 (C-1), 69.2 (C-2''), 66.7 (C-4''), 62.7 (C-5), 62.0 (C-6'), 60.8 (C-6''), 32.3 (C-4), 29.1 (C-2), 22.1 (C-3), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (COCH₃) ppm.

8-[2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-1-(hydroxyoctyl)-2,3,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl]-octanol (98)

Ansatz nach AAV 3a

1,8-Octandiol: 6.278 g (43 mmol, 10 Äq.)

LacAc₇Br (**69**): 3.003 g (4.3 mmol, 1 Äq.)

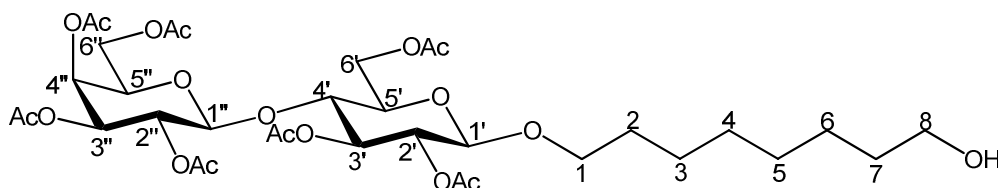
Ag₂O: 622 mg (2.85 mmol, 0.6 Äq.)

Iod: katalytische Menge

35 mL CHCl₃

Ausbeute: 2.52 g (60%), als farbloser Sirup nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EE, 1:2)

$R_f = 0.42$ (Cy/EE, 1:5)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.28 (dd, J = 0.7, 3.4 Hz, 1H, 4'-H), 5.12 (t, J = 9.3 Hz, 1H, 3'-H), 5.04 (dd, J = 7.9, 10.4 Hz, 1H, 2'-H), 4.89 (dd, J = 10.4, 3.5 Hz, 1H, 3''-H), 4.81 (dd, J = 9.5, 7.9 Hz, 1H, 2''-H), 4.42 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1''-H), 4.41 – 4.39 (m, 1H, 6'a-H), 4.38 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.06 – 4.01 (m, 3H, 6''-, 6'b-H), 3.82 – 3.71 (m, 3H, 5''-, 1a-, 4'-H), 3.57 – 3.51 (m, 3H, 8-, 5'-H), 3.40 – 3.36 (m, 1H, 1b-H), 2.08, 2.05, 2.00, 1.98, 1.97, 1.96, 1.89 (s, 3H, COCH₃), 1.50 – 1.46 (m, 4H, 2-, 7-H), 1.30 – 1.21 (m, 8H, 6-, 5-, 3-, 4-H) ppm.

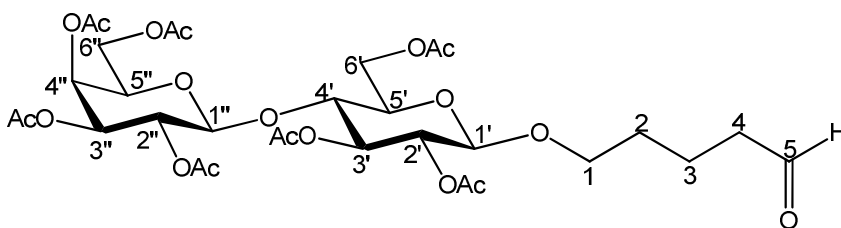
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.78, 170.72, 170.52, 170.43, 170.18, 170.00, 169.45 (COCH₃), 101.43 (C-1'), 100.95 (C-1''), 76.71 (C-4'), 73.24 (C-5'), 72.97 (C-3'), 72.15 (C-2'), 71.38 (C-3''), 71.06 (C-5''), 70.50 (C-1), 69.53 (C-2'), 67.02 (C-4''), 63.31 (C-8), 62.41 (C-6'), 61.20 (C-6''), 33.08 (C-7), 29.70 (C-2), 29.62 (C-4), 29.52 (C-5), 29.02 (C-3), 26.00 (C-6), 21.23, 21.18, 21.05, 20.99, 20.86 (COCH₃) ppm.

5-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-pentanaldehyd (99)

977 mg (2.8 mmol, 3.5 Äq.) PDC werden in eine Lösung von 469 mg (0.65 mmol, 1 Äq.) LacAc₇-L5-Alkohol (97) in 6.5 mL DMF gegeben. Die dunkelrote Mischung wird bei RT für 5 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wird die Reaktionsmischung in H₂O gegeben (20 mL) und es wird zweimal mit je 15 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 10 mL H₂O und einmal mit 15 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie mit Cy/EE (1:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 191 mg (41.5%), als farbloser Sirup

$R_f = 0.26$ (Cy/EE, 1:2)



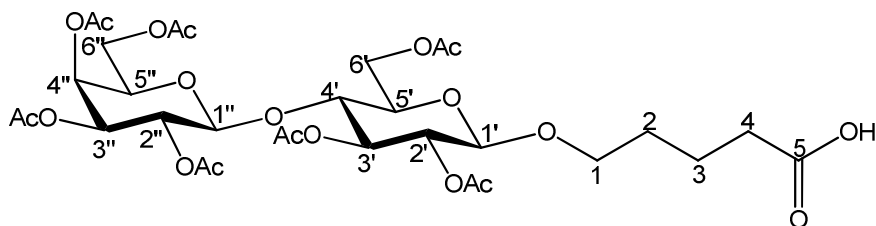
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 9.74 (t, 1H, 5-H), 5.33 (dd, J = 0.9, 3.4 Hz, 1H, 4'-H), 5.17 (t, J = 9.2 Hz, 1H, 3'-H), 5.09 (dd, J = 10.4, 7.9 Hz, 1H, 2'-H), 4.94 (dd, J = 10.4, 3.4 Hz, 1H, 3''-H), 4.86 (dd, J = 9.4, 7.9 Hz, 1H, 2''-H), 4.48 (m, 2H, 1'-H, 6'a-H), 4.44 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.08 (m, 3H, 6'a-, 6'b-, 6'b-H), 3.81 (m, 3H, 5''-, 1a-, 4'-H), 3.58 (m, 1H, 5'-H), 3.46 (m, 1H, 1b-H), 2.43 (t, J = 7.3 Hz, 1H, 4-H), 2.13, 2.10, 2.04, 2.03, 2.02, 1.95 (s, 3H, COCH₃), 1.63 (m, 4H, 3-, 2-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 202.1 (C-5), 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 169.6, 169.0, (COCH₃), 101.0 (C-1'), 100.5 (C-1'), 76.2 (C-4'), 72.8 (C-3'), 72.6 (C-5'), 71.7 (C-2'), 71.0 (C-3'), 70.7 (C-5'), 69.4 (C-1), 69.1 (C-2'), 66.6 (C-4'), 61.9 (C-6'), 60.8 (C-6'), 43.3 (C-4), 28.7 (C-2), 20.8, 20.6, 20.5 (COCH₃), 18.5 (C-3) ppm.

5-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-pentansäure (100)

In eine Lösung von 190 mg (0.276 mmol, 1 Äq.) LacAc₇-L-Aldehyd (**99**) in 1.5 mL Lösungsmittelmischung aus ^tBuOH/H₂O (10:1) werden 0.24 mL (2.015 mmol, 7.3 Äq.) 2,3-Methyl-2-buten, 42 mg (0.353 mmol, 1.3 Äq.) KH₂PO₄ und 42 mg (0.376 mmol, 1.4 Äq.) NaClO₂ bei RT zugegeben. Die Mischung wird bei RT über Nacht gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung wird die Reaktionsmischung mit 10 mL H₂O verdünnt und mit EE (6 x 15 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie mit EE/Cy (2:1) aufgereinigt. Man erhält 78 mg (40%) sauberes Produkt.

$R_f = 0.14$ (Cy/EE, 1:2)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.27 (dd, J = 0.8, 3.3 Hz, 1H, 4'-H), 5.12 (t, J = 9.2 Hz, 1H, 3'-H), 5.03 (t, J = 7.9 Hz, 1H, 2'-H), 4.91 (dd, J = 10.4, 3.4 Hz, 1H, 3''-H), 4.81 (t, J = 9.3 Hz, 1H, 2'-H), 4.42 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1''-H), 4.41 – 4.40 (m, 1H, 6'a-H), 4.39 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.06 – 4.02 (m, 3H, 6'a-, 6'b-, 6'b'-H), 4.83 – 3.78 (m, 2H, 5''-, 1a-H), 3.73 (t, J = 9.2 Hz, 1H, 4'-H), 3.55 - 3.51 (m, 1H, 5'-H), 3.42 – 3.38 (m, 1H, 1b-H), 2.26 (t, J = 7.3 Hz, 1H, 4-H), 2.08, 2.05, 2.00, 1.99, 1.98, 1.97, 1.90 (s, 3H, COCH₃), 1.65 – 1.52 (m, 4H, 3-, 2-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 178.16 (C-5), 170.87, 170.78, 170.57, 170.48, 170.23, 170.10, 169.50 (COCH₃), 101.41 (C-1'), 100.84 (C-1'), 76.66 (C-4'), 73.20 (C-3'), 72.95 (C-5'), 72.05 (C-2'), 71.36 (C-3'), 71.02 (C-5'), 69.76 (C-1), 69.50 (C-2'), 67.01 (C-4'), 62.41 (C-6'), 61.20 (C-6'), 33.73 (C-4), 29.00 (C-2), 21.54 (C-3), 21.22, 21.17, 21.00, 20.87 (COCH₃) ppm.

1-(Hepta-*O*-acetyl- β -D-lactosyloxy)-4-(prop-2-ynyloxy(Z))but-2-en (101)

Ansatz nach AAV 3b

LacAc₈: 5 g (7.4 mmol, 1 Äq.)

Alkohol: 0.53 g

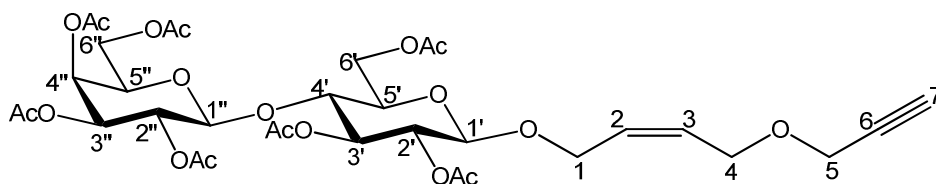
BF₃-Et₂O: 1.4 mL (1.1 mmol, 0.15 Äq.)

DCM: 100 mL

K₂CO₃: 1.6 g

Ausbeute: 4.0 g (73%), als hellbrauner Sirup

$R_f = 0.32$ (Cy/EE, 1:1)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.81 – 5.73 (m, 1H, 3-H), 5.73 – 5.65 (m, 1H, 2-H), 5.35 (dd, J = 3.4, 1.0 Hz, 1H, 4' '-H), 5.20 (t, J = 9.3 Hz, 1H, 3' -H), 5.11 (dd, J = 10.4, 7.9 Hz, 1H, 2' '-H), 4.97 (dd, J = 10.4, 3.5 Hz, 1H, 3' '-H), 4.90 (dd, J = 9.5, 7.9 Hz, 1H, 2' -H), 4.53 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1' -H), 4.51 (m, 1H, 6' a-H), 4.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1' '-H), 4.37 - 4.22 (m, 2H, 1-H), 4.22 – 4.05 (m, 7H, 4-, 5-, 6' '-, 6' b-H), 3.88 (dd, 1 H, 5' '-H), 3.82 (dd, 1 H, 4' -H), 3.62 (ddd, J = 9.9, 4.9, 2.1 Hz, 1H, 5' -H), 2.48 (t, J = 2.4 Hz, 1H, 7-H), 2.16, 2.14, 2.07, 2.05, 1.97, 1.89 (s, 3H, COCH₃) ppm.

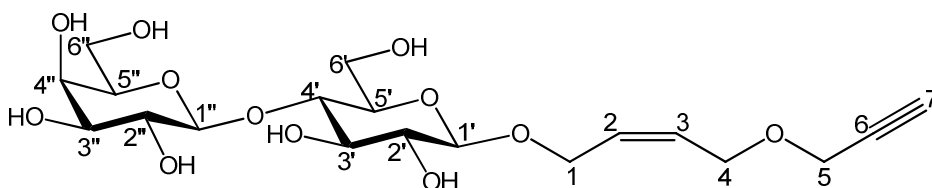
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.33, 170.31, 170.11, 170.02, 169.74, 169.61, 169.04 (COCH₃), 129.45 (C-2), 128.87 (C-3), 101.07 (C-1' '), 99.16 (C-1'), 79.28 (C-6), 76.23 (C-4'), 74.81 (C-7), 72.88 (C-3'), 72.63 (C-5'), 71.61 (C-2'), 70.98 (C-3''), 70.68 (C-5''), 69.13 (C-2''), 66.61 (C-4''), 64.92 (C-4), 64.97 (C-5), 64.62 (C-1), 61.97 (C-6''), 60.79 (C-6'), 20.86, 20.79, 20.71, 20.61, 20.48 (COCH₃) ppm.

1-(β -D-Lactosyloxy)-4-(prop-2-ynyloxy(Z))but-2-en (102)

Ansatz nach AAV 7

LacAc₇-L-alkin (101): 3.0 g (4.03 mmol)

Ausbeute: 1.43 g (79%), als hellgelber Feststoff



¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 5.81 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.45 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.40 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1''-H), 4.38 (m, 2H, 1-H), 4.17 (m, 4H, 4-, 5-H), 3.93 (dd, J = 12.4, 2.1 Hz, 1H, 6'a-H), 3.87 (d, J = 3.1 Hz, 1H, 4''-H), 3.78-3.67 (m, 3H, 6'b-, 6''-H), 3.66 (m, 1H, 5''-H), 3.60 (m, 3H, 3'-, 3''-, 4'-H), 3.53 (m, 1H, 5'-H), 3.49 (dd, J = 8.0, 9.5 Hz, 1H, 2'-H), 3.27 (dd, J = 7.9, 10.4 Hz, 1H, 2''-H), 2.88 (dd, 1H, 7-H) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 126 MHz): δ = 130.0 (C-3), 129.4 (C-2), 103.7 (C-1'), 101.3 (C-1''), 79.8 (C-6), 78.8 (C-4'), 76.6 (C-7), 75.8 (C-5'), 75.2 (C-5''), 74.8 (C-3'), 73.2 (C-2'), 73.0 (C-3''), 71.4 (C-2''), 69.0 (C-4''), 65.2 (C-4), 65.1 (C-1), 61.4 (C-6'), 60.5 (C-6''), 57.43 (C-5) ppm.

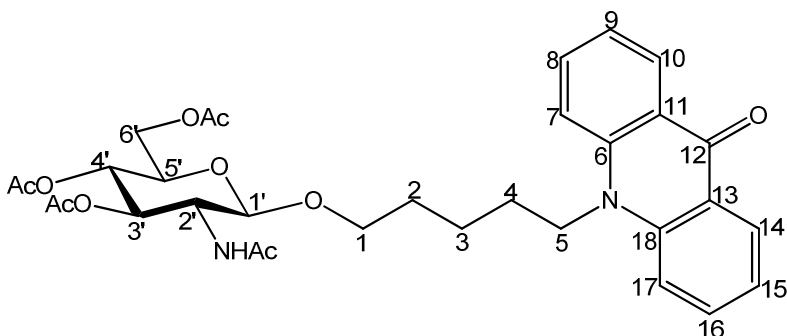
1-O-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-pentyl-10H-acridin-9-on (103)

In eine Lösung von 1.0 g (3.31 mmol, 2 Äq.) Oxazolin (43) und 0.465 g (1.66 mmol, 1 Äq.) Acr-P-OH (29) in 5 mL absolutem Chloroform werden 445 mg (3.31 mmol, 2 Äq.) wasserfreies CuCl₂ bei 50 °C unter Stickstoff als Schutzgas zugegeben und über Nacht bei 65 °C refluxiert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand in 40 mL EE aufgenommen und mit 1 M HCl (2 x 40 mL), ges. NaHCO₃-Lösung (2 x 40 mL) und ges. NaCl-Lösung (2 x 40 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wird mit EE (2 x 40 mL) rückextrahiert.

Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit EE/Cy/ Et_3N (80:10:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 841 mg (83%), als gelber Feststoff.

$R_f = 0.15$ (EE/Cy/ Et_3N , 80:10:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.00$ (dd, $J = 1.5, 8.0$ Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.65 - 7.62 (m, 2H, 8-, 16-H), 7.39 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.21 - 7.18 (m, 2H, 9-, 15-H), 6.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NH), 5.26 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, 3'-H), 5.03 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, 4'-H), 4.67 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, 1'-H), 4.23 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H, 5-H), 4.18 (dd, $J = 4.7, 12.4$ Hz, 1H, 6'a-H), 4.09 - 4.05 (m, 1H, 6'b-H), 3.84 - 3.82 (m 2H, 1a-, 2'-H), 3.66 - 3.62 (m, 1H, 5'-H), 3.50 - 3.48 (m, 1H, 1b-H), 1.98, 1.97, 1.96, 1.95, 1.87 (s, 3H, COCH_3), 1.85 - 1.82 (m, 2H, 4-H), 1.65 - 1.61 (m, 2H, 2-H), 1.56 - 1.52 (m, 2H, 3-H) ppm.

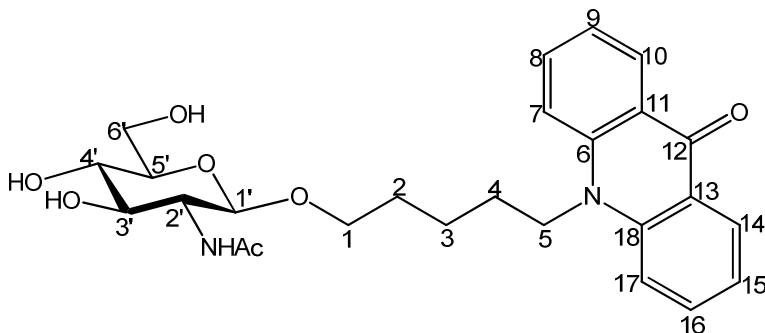
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 177.56$ (C-12), 170.85 (NHCO), 170.51, 170.36, 170.02, 169.15 (COCH_3), 141.42 (C-13, -11), 133.76 (C-16, -8), 127.62 (C-10, -14), 122.01 (C-6, -18), 121.04 (C-9, -15), 114.35 (C-7, -17), 100.52 (C-1'), 72.70 (C-3'), 71.56 (C-5'), 68.95 (C-1), 68.49 (C-4'), 61.92 (C-6'), 54.48 (C-2'), 28.97 (C-2), 26.63 (C-4), 23.06 (C-3), 20.45, 20.42, 20.36 (COCH_3) ppm.

1-O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-pentyl-10H-acridin-9-on (104)

Ansatz nach AAV 7

GlcNAcAc₃-P-Acr (103): 500 mg

Ausbeute: 360 mg (90%), als hellgelber Feststoff



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.36 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.82 - 7.79 (m, 2H, 8-, 16-H), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.28 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, 9-, 15-H), 4.42 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, 5-H), 4.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 1'-H), 3.80 - 3.78 (m, 1H, 1a-H), 3.69 (dd, 1H, 6'-a-H), 3.55 - 3.45 (m, 3H, 6'-b-, 2'-, 1b-H), 3.33 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, 3'-H), 3.15 - 3.13 (m, 2H, 4'-, 5'-H), 1.86 - 1.84 (m, 2H, 4-H), 1.61 - 1.59 (m, 2H, 2-H), 1.56 - 1.52 (m, 2H, 3-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 179.97 (C-12), 173.38 (NHCO), 144.48 (C-13, -11), 137.12 (C-16, -8), 129.67 (C-10, -14), 124.54 (C-6, -18), 124.03 (C-9, -15), 118.44 (C-7, -17), 103.98 (C-1'), 79.61 (C-5'), 77.19 (C-3'), 73.50 (C-4'), 71.23 (C-1), 63.99 (C-6'), 58.42 (C-2'), 48.30 (C-5), 31.76 (C-2), 29.46 (C-4), 25.53 (C-3), 25.20 (NHCOCH₃) ppm.

1-*O*-(β-D-Galatopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl)-pentyl-10*H*-acridin-9-on (105)

Zuerst Ansatz nach AAV 3c

LacAc₇-1-NHCCl₃ (**51**): 1 g (1.28 mmol, 4 Äq.)

Acr-P-OH (**29**): 90 mg (0.32 mmol, 1 Äq.)

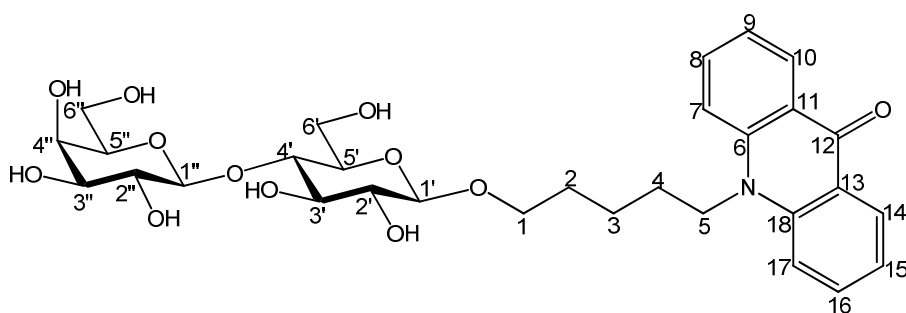
AgOTf: 82 mg (0.32 mmol, 1 Äq.)

DCM*: 20 mL

Ausbeute des Acetyl-geschützten Produkts (LacAc₇-P-Acr): 115 mg, nach der Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/Cy, 2:1 + 0.3% Et₃N)

115 mg LacAc₇-P-Acr werden dann nach AAV 7 entschützt.

Ausbeute: 45 mg (23%, bezogen auf Acr-P-OH), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Reinigung über RP-C18-Kieselgel, Elutionsmittel: 20% ~ 50% MeOH in H₂O



¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.24 (dd, 2H, J = 1.4, 8.0 Hz, 14-, 10-H), 7.72 (ddd, 2H, J = 1.6, 6.8, 8.7 Hz, 16-, 8-H), 7.62 (d, 2H, J = 8.8 Hz, 17-, 7-H), 7.22 (t, 2H, J = 7.3 Hz, 15-, 9-H), 4.34 (d, 1H, J = 7.4 Hz, 1'-H), 4.29 (d, 1H, J = 7.9 Hz, 1'-H), 4.21 (t, 2H, J = 7.9 Hz, 5-H), 3.85 – 3.80 (m, 3H, 6'-a-, 1a-, 4'-H), 3.75 – 3.71 (m, 2H, 6'-b-, 6'-a-H), 3.65 (dd, 1H, J = 4.1, 11.7 Hz, 6'-b-H), 3.55 – 3.46 (m, 5H, 1b-, 4'-, 3'-, 3'-, 2'-H), 3.22 (m, 1H, 2'-H), 1.70 -1.65 (m, 2H, 4-H), 1.63 – 1.56 (m, 2H, 2-H), 1.50 – 1.44 (m, 2H, 3-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, MeOD): δ = 180.52 (C-12), 143.28 (C-6, -18), 136.59 (C-8, -16), 128.48 (C-14, -10), 123.54 (C-9, -15), 122.95 (C-11, -13), 117.25 (C-7, -17), 105.09 (C-1'-), 104.35 (C-1'), 80.60 (C-4'), 77.37 (C-5'-), 76.75 (C-5'), 76.63 (C-3'), 74.92 (C-3'-), 74.78 (C-2'), 72.96 (C-2'-), 71.60 (C-1), 70.58 (C-4'-), 62.92 (C-6'-), 62.11 (C-6'), 47.50 (C-5), 30.61 (C-2), 28.41 (C-4), 24.37 (C-3) ppm.

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-(Hepta-*O*-acetyl- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)-pentyl]-10*H*-acridin-9-on (106)

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-(β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)-pentyl]-10*H*-acridin-9-on (107)

Zuerst Ansatz nach AAV 3c

LacAc₇-1-NHCCl₃ (**51**): 3 g (3.84 mmol, 4 Äq.)

Acr-D-P-OH (**30**): 0.337 g (0.96 mmol, 1 Äq.)

AgOTf: 0.247 g (0.96 mmol, 1 Äq.)

DCM*: 60 mL

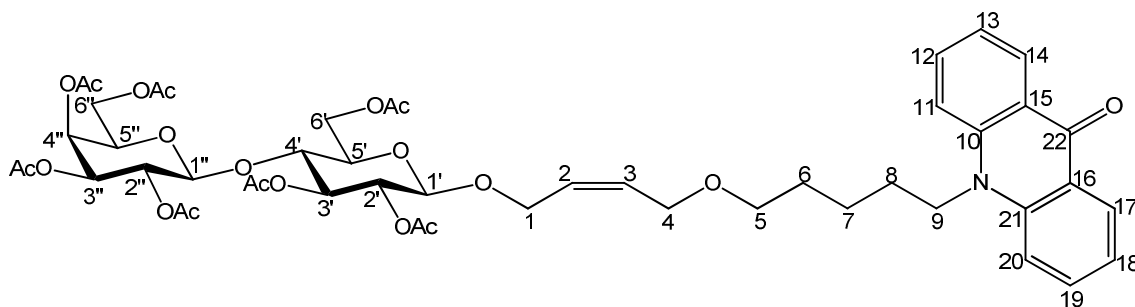
Ausbeute Produkt **99**: 1.4 g (nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Cy/EE, 1:4 + 0.3% Et₃N)

R_f = 0.22 (Cy/EE, 1:3 für Produkt **106**)

1.4 g Produkt **106** werden dann nach AAV 7 entschützt.

Ausbeute: 0.49 g (76% bezogen auf Acr-D-P-OH), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über RP-C18-Kieselgel (Elutionsmittel: 30% ~ 50% MeOH in H₂O)

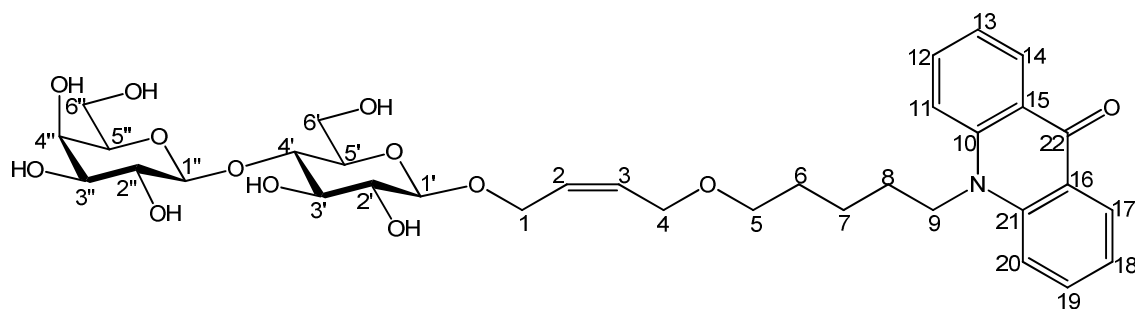
R_f = 0.15 (C/M, 5:1 für Produkt **107**)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.51 (dd, 2H, J = 1.7, 8.0 Hz, H_{ar}), 7.66 (ddd, 2H, J = 1.8, 7.0, 8.7 Hz, H_{ar}), 7.43 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H_{ar}), 7.22 (ddd, 2H, H_{ar}), 5.65-5.61 (m, 2H, 2-H, 3-

H), 5.59 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, 1'-H), 5.46 (dd, 1H, $J = 1.4, 2.6$ Hz, 3'-H), 5.31 (dd, 1H, $J = 9.6$ Hz, 4'-H), 5.11 (dd, 1H, $J = 8.0, 10.4$ Hz, 2''-H), 4.94 (dd, 1H, $J = 3.5, 10.4$ Hz, 3''-H), 4.54 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, 1''-H), 4.30 (t, 2H, $J = 8.4$ Hz, 9-H), 4.24 (m, 1H, 2'-H), 4.18 (dd, 1H, $J = 2.3, 12.0$ Hz, 6''-H_a), 4.05 (m, 5H, 6''-H_b, 1-H, 6'-H), 3.99 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz, 4-H), 3.86 (ddd, 1H, 5''-H), 3.77 (ddd, 1H, 5'-H), 3.58 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, 4'-H), 3.41 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, 5-H), 2.09, 2.09, 2.08, 2.04, 2.04, 1.99, 1.96 (s, 3H, COCH₃), 1.90 (m, 2H, 8-H), 1.66 (m, 2H, 6-H), 1.60 (m, 2H, 7-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 178.3$ (C-22), 171.0, 170.7, 170.6, 170.4, 170.0, 169.8, 169.5 (COCH₃), 142.2 (2C_{ar}), 134.3 (2C_{ar}), 129.7 (C-3), 128.9 (C-2), 128.4 (2C_{ar}), 122.9 (2C_{ar}), 121.6 (2C_{ar}), 114.9 (2C_{ar}), 102.9 (C-1'), 98.1 (C-1'), 78.0 (C-4'), 73.1 (C-2'), 71.3 (C-5'), 71.2 (C-3'), 70.6 (C-5), 70.4 (C-3'), 69.2 (C-2'), 67.4 (C-5'), 67.2 (C-4'), 67.0 (C-4), 63.8 (C-6'), 61.3 (C-1), 60.2 (C-6'), 46.5 (C-9), 29.9 (C-6), 27.4 (C-8), 24.2 (C-7), 21.3, 21.2, 21.0, 21.0, 20.9, 20.8 (COCH₃) ppm.



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 8.33$ (dd, 2H, $J = 1.4, 8.0$ Hz, H_{ar}), 7.72 (ddd, 2H, $J = 1.6, 6.8, 8.7$ Hz, H_{ar}), 7.62 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H_{ar}), 7.22 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, H_{ar}), 5.59 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, 1'-H), 5.54 (m, 2H, 2-H, 3-H), 4.35 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz, 9-H), 4.25 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 1''-H), 4.17 (t, 1H, $J = 3.6$ Hz, 2'-H), 4.06 (t, 1H, $J = 3.6$ Hz, 3'-H), 4.02 (d, 2H, $J = 4.6$ Hz, 1-H), 3.95 (d, 2H, $J = 4.6$ Hz, 4-H), 3.69 (m, 4H, 6'-H, 6''-H), 3.60 (m, 2H, 5'-H, 5''-H), 3.55 (dd, 1H, $J = 3.8, 9.6$ Hz, 4'-H), 3.45 (m, 2H, 4''-H, 2''-H), 3.37 (m, 3H, 3''-H, 5-H), 1.80 (m, 2H, 8-H), 1.59 (m, 2H, 6-H), 1.54 (m, 2H, 7-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): $\delta = 180.1$ (C-22), 143.6 (2C_{ar}), 136.2 (2C_{ar}), 130.5 (C-3, C-2), 128.7 (2C_{ar}), 123.5 (2C_{ar}), 122.6 (2C_{ar}), 119.7 (2C_{ar}), 106.8 (C-1'), 99.3 (C-1'), 80.8 (C-4'), 78.8 (C-2'), 77.4 (C-4'), 75.3 (C-3'), 73.3 (C-3'), 73.0 (C-2'), 72.9 (C-5'), 71.6 (C-5), 70.8 (C-5'), 67.8 (C-4), 63.1 (C-6'), 63.1 (C-6'), 60.6 (C-1), 47.4 (C-9), 30.8 (C-6), 28.5 (C-8), 24.9 (C-7) ppm.

5-(4-*O*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyloxy)-methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-pentyl-10*H*-acridin-9-on (108)

Ansatz nach AAV 8

GlcNAcAc₃- β -Prop (**44**): 194 mg (0.503 mmol, 1.3 Äq.) in 2.5 mL EtOH

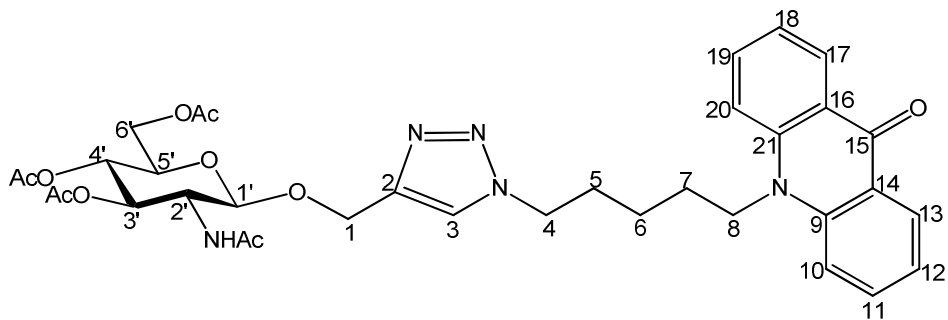
Acr-N₃ (**34**): 115 mg (0.375 mmol, 1 Äq.) in 2.5 mL EtOH

CuSO₄·5H₂O (1 M): 0.2 mL

Ascorbat: 49 mg (0.24 mmol, 0.5 Äq.) in 5 mL H₂O

Ausbeute: 88 mg (34%), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über RP-C18-Kieselgel

$R_f = 0.51$ (C/M, 5:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.46 (d, J = 7.5 Hz, 2H, 13-, 17-H), 7.64 (t, J = 7.0 Hz, 2H, 19-, 11-H), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 20-, 10-H), 7.20 (m, 3H, 3-, 18-, 12-H), 6.26 (s_{br}, 1H, NH), 5.21 (t, J = 9.8 Hz, 1H, 3'-H), 5.03 (t, J = 10.4 Hz, 1H, 4'-H), 4.89 (m, 1H, 1a-H), 4.84 (d, J = 8.1 Hz, 1H, 1'-H), 4.75 (s_{br}, 1H, 1b-H), 4.33 (m, 2H, 4-H), 4.22 (m, 3H, 8-, 6'-a-H), 4.08 (dd, J = 1.3, 12.1 Hz, 1H, 6'-b-H), 3.93 (d, J = 8.7 Hz, 1H, 2'-H), 3.69 (m, 1H, 5'-H), 2.09, 1.98, 1.96, 1.95 (s, 3H, COCH₃), 1.88 – 1.80 (m, 4H, 5-, 7-H), 1.50 – 1.44 (m, 2H, 6-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 176.91 (C-15), 169.81, 169.70, 169.45, 168.42 (COCH₃), 140.57 (C-9, -21), 133.07 (C-19, -11), 126.91 (C-13, -17), 121.34 (C-12, -18), 120.35 (C-3, -14, -16), 113.47 (C-10, -20), 99.55 (C-1'), 71.52 (C-3'), 70.90 (C-5'), 67.53 (C-4'), 62.04

(C-1), 61.04 (C-6'), 53.45 (C-2'), 49.05 (C-4), 44.60 (C-8), 28.94 (C-5), 25.55 (C-7), 22.75 (C-6), 22.31, 19.79, 19.70, 19.64 (COCH₃) ppm.

5-(4-*O*-(2-Acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyloxy)-methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-pentyl-10*H*-acridin-9-on (109)

Ansatz nach AAV 8

GlcNAc-β-Prop (45): 194 mg (0.748 mmol, 1.3 Äq.) in 2.5 mL EtOH

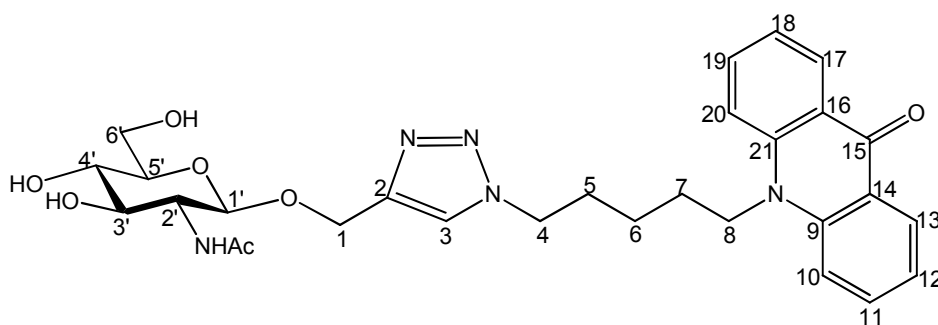
Acr-N₃ (34): 171 mg (0.558 mmol, 1 Äq.) in 2.5 mL EtOH

CuSO₄·5H₂O (1 M): 0.2 mL

Ascorbat: 49 mg (0.24 mmol, 0.5 Äq.) in 5 mL H₂O

Ausbeute: 177 mg (56%), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

R_f = 0.54 (C/M, 2:1)



¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.44 (dd, *J* = 1.5, 8.0 Hz, 2H, 13-, 17-H), 8.02 (s, 1H, 3-H), 7.83 (m, 2H, 19-, 11-H), 7.73 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 20-, 10-H), 7.32 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, 18-, 12-H), 4.94 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, 1a-H), 4.79 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, 1b-H), 4.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 1'-H), 4.45 (m, 4H, 4-, 8-H), 3.91 (dd, *J* = 2.2, 12.1 Hz, 1H, 6'a-H), 3.72 (m, 2H, 6'b-, 2'-H), 3.52 (m, 1H, 3'-H), 3.33 (m, 2H, 4'-, 5'-H), 2.05 – 2.01 (m, 2H, 5-H), 1.96 – 1.91 (m, 2H, 7-H), 1.59 – 1.54 (m, 2H, 6-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 180.16 (C-15), 174.23 (NHCO), 143.55 (C-9, -21), 136.21 (C-19, -11), 128.60 (C-13, -17), 123.42 (C-14, -16), 123.09 (C-12, -18), 117.16 (C-10, -20), 102.31 (C-1'), 78.49 (C-3'), 76.47 (C-5'), 72.58 (C-4'), 63.34 (C-1), 63.23 (C-6'), 57.74 (C-2'), 51.57 (C-4), 47.18 (C-8), 31.30 (C-5), 28.11 (C-7), 24.88 (C-6), 23.51 (NHCOCH₃) ppm.

5-(4-*O*-(α -D-Glucopyranosyloxy)-methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-pentyl-10*H*-acridin-9-on (110)

Ansatz nach AAV 8

Glc- α -Prop (**54**): 318 mg (1.46 mmol, 1.3 Äq.) in 5 mL EtOH

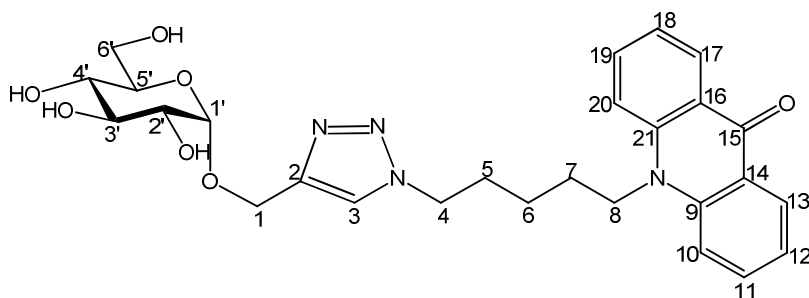
Acr-N₃ (**34**): 346 mg (1.13 mmol, 1 Äq.) in 5 mL EtOH

CuSO₄·5H₂O (1 M): 0.4 mL

Ascorbat: 98 mg (0.49 mmol, 0.5 Äq.) in 10 mL H₂O

Ausbeute: 271 g (46%), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über RP-C18-Kieselgel

R_f = 0.22 (C/M, 4:1)



^1H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.00 (dd, J = 1.6, 8.0 Hz, 2H, 13-, 17-H), 7.93 (s, 1H, 3-H), 7.53 – 7.42 (m, 2H, 11-, 19-H), 7.15 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 10-, 20-H), 7.02 (t, J = 7.1 Hz, 2H, 12-, 18-H), 4.97 (d, J = 3.7 Hz, 1H, 1'-H), 4.77 (m, 1H, 1a-H), 4.66 (d, J = 12.6 Hz, 1H, 1b-H), 4.28 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-H), 3.77 (dd, J = 11.8, 1.9 Hz, 2H, 8-H), 3.75 – 3.66 (m, 2H, 6'-, 3'-H), 3.61 (ddd, J = 9.7, 4.9, 2.2 Hz, 1H, 5'-H), 3.51 (dd, J = 9.8, 3.7 Hz, 1H, 2'-H),

3.40 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, 4'-H), 1.80 – 1.62 (m, 2H, 5-H), 1.43 – 1.26 (m, 2H, 7-H), 1.24 – 1.09 (m, 2H, 6-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 179.64$ (C-15), 145.31 (C-9, -21), 142.28 (C-16, -14), 135.94 (C-11, -19), 127.78 (C-13, -17), 125.99 (C-3), 122.98 (C-12, -18), 122.11 (C-2), 116.40 (C-10, -20), 99.49 (C-1'), 74.71 (C-3'), 73.64 (C-5'), 72.95 (C-2'), 71.20 (C-4'), 62.14 (C-6'), 61.59 (C-1), 51.34 (C-4), 46.61 (C-8), 30.52 (C-5), 27.30 (C-7), 24.16 (C-6) ppm.

5-(4-*O*-(β -D-Glucopyranosyloxy)-methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-pentyl-10*H*-acridin-9-on (111)

Ansatz nach AAV 8

Glc- β -Prop (**56**): 318 mg (1.176 mmol, 1.2 Äq.) in 2 mL EtOH

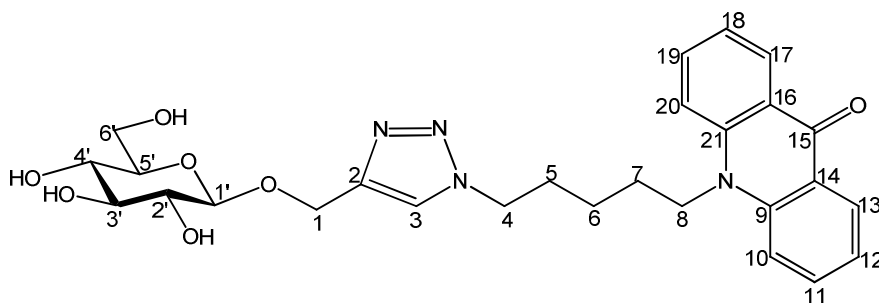
Acr-N₃ (**32**): 300 mg (0.980 mmol, 1 Äq.) in 2 mL EtOH

CuSO₄·5H₂O: 95 mg (0.392 mmol, 0.4 Äq.) in 1 mL H₂O

Ascorbat: 98 mg (0.490 mmol, 0.5 Äq.) in 1 mL H₂O

Ausbeute: 271 mg (53%), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über RP-C18-Kieselgel

$R_f = 0.19$ (C/M, 8:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = 7.91$ (dd, $J = 1.7, 8.1$ Hz, 2H, 13-, 17-H), 7.87 (s, 1H, 3-H), 7.38 (ddd, $J = 8.7, 7.0, 1.6$ Hz, 2H, 19-, 11-H), 7.02 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 20-, 10-H), 6.93 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 18-, 12-H), 4.88 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, 1a-H), 4.72 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, 1b-H), 4.45 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 1'-H), 4.21 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, 4-H), 3.86 (dd, $J = 12.3, 2.0$ Hz, 1H,

6'-a-H), 3.70 – 3.62 (m, 3H, 8-, 6'-b-H), 3.42 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, 3'-H), 3.38 – 3.35 (m, 1H, 5'-H), 3.32 (dd, $J = 11.7, 10.9$ Hz, 1H, 4'-H), 3.24 (dd, $J = 9.2, 7.9$ Hz, 1H, 2'-H), 1.67 – 1.55 (m, 2H, 5-H), 1.31 – 1.20 (m, 2H, 7-H), 1.10 – 1.01 (m, 2H, 6-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 179.59$ (C-15), 145.19 (C-2), 142.20 (C-9, -21), 135.93 (C-19, -11), 127.75 (C-13, -17), 126.14 (C-3), 122.97 (C-12, -18), 122.05 (C-14, -16), 116.36 (C-10, -20), 103.27 (C-1'), 77.62 (C-3'), 77.45 (C-5'), 74.69 (C-2'), 71.25 (C-4'), 63.33 (C-1), 62.40 (C-6'), 51.34 (C-4), 46.61 (C-8), 30.47 (C-5), 27.26 (C-7), 24.10 (C-6) ppm.

5-(4-*O*-(α -D-Galactopyranosyloxy)-methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-pentyl-10*H*-acridin-9-on (112)

Ansatz I nach AAV 8

Gal- α -Prop (57): 300 mg (1.37 mmol, 1.3 Äq.) in 3 mL EtOH

Acr- N_3 (34): 321 mg (1.05 mmol, 1 Äq.) in 3 mL EtOH

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1M): 0.2 mL

Ascorbat: 93 mg (0.53 mmol, 0.5 Äq.) in 5 mL H_2O

Ausbeute: 0.35 g (63%), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

Ansatz II mittels β -Galactosidase

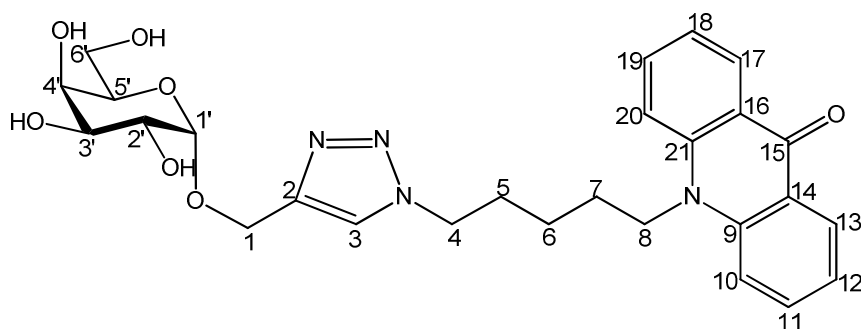
Gal-T-P-Acr (α , β gemischt): 75 mg

β -Galactosidase (9.1 U/mg): 6 mg

NaH_2PO_4 (1 M): 20 mL

Ausbeute: 15 mg hellgelber Feststoff als sauberes reines α -Produkt nach säulenchromatographischer Aufreinigung über RP-C18-Kieselgel

$R_f = 0.23$ (C/M, 4:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.35 (d, J = 7.9 Hz, 3H, 13-, 17-H), 7.92 (s, 1H, 3-H), 7.72 (m, 2H, 11-, 19-H), 7.62 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 10-, 20-H), 7.22 (td, J = 0.8, 7.3 Hz, 2H, 12-, 18-H), 4.84 (d, J = 3.7 Hz, 1H, 1'-H), 4.71 (m, 1H, 1a-H), 4.57 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 1b-H), 4.35 (m, 4H, 8-, 4-H), 3.79 (dd, J = 1.2, 3.2 Hz, 1H, 4'-H), 3.75 (m, 1H, 3'-H), 3.68 (dd, J = 10.1, 3.8 Hz, 1H, 2'-H), 3.63 (m, 3H, 5'-, 6'-H), 1.94 – 1.91 (m, 2H, 5-H), 1.85 – 1.79 (m, 2H, 7-H), 1.48 – 1.43 (m, 2H, 6-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 180.18 (C-15), 146.06 (C-2), 143.58 (C-9, -21), 136.31 (C-11, -19), 128.64 (C-13, -17), 125.64 (C-3), 123.46 (C-16, -14), 123.09 (C-12, -18), 117.11 (C-10, -20), 100.37 (C-1'), 73.18 (C-3'), 71.89 (C-5'), 71.51 (C-4'), 70.62 (C-2'), 63.27 (C-6'), 61.97 (C-1), 51.49 (C-4), 47.14 (C-8), 31.30 (C-5), 28.10 (C-7), 24.87 (C-6) ppm.

5-(4-*O*-(β-D-Galactopyranosyloxy)-methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-pentyl-10*H*-acridin-9-on (113)

Ansatz I nach AAV 8

Gal-β-Prop (**59**): 300 mg (1.37 mmol, 1 Äq.) in 5 mL H₂O

Acr-N₃ (**34**): 420 mg (1.37 mmol, 1 Äq.) in 5 mL ^tBuOH

CuSO₄·5H₂O: 332 mg (1.37 mmol, 1 Äq.) in 2.5 mL H₂O

Na-Ascorbat: 271 mg (1.37 mmol, 1 Äq.) in 2.5 mL H₂O

Ausbeute: 0.50 g (71%), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

Ansatz II

Gal- β -Prop (**59**): 121 mg (0.55 mmol, 1.3 Äq.) in 3 mL EtOH

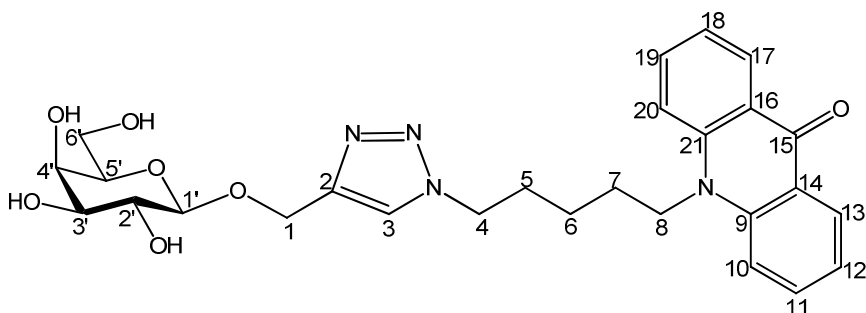
Acr-N₃ (**34**): 130 mg (0.43 mmol, 1 Äq.) in 3 mL EtOH

CuSO₄·5H₂O (1M): 0.2 mL

Ascorbat: 38 mg (0.19 mmol, 0.5 Äq.) in 5 mL H₂O

Ausbeute: 166 mg (74%), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

$R_f = 0.24$ (C/M, 4:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.12 (dd, J = 1.7, 8.1 Hz, 2H, 13-, 17-H), 7.89 (s, 1H, 3-H), 7.58 (ddd, J = 8.7, 7.0, 1.6 Hz, 2H, 19-, 11-H), 7.33 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 20-, 10-H), 7.11 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 18-, 12-H), 4.88 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 1a-H), 4.71 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 1b-H), 4.34 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.28 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 4-H), 4.06 – 3.97 (m, 2H, 8-H), 3.80 (t, J = 3.0 Hz, 1H, 3'-H), 3.75 – 3.63 (m, 2H, 6'-H), 3.54 (ddd, J = 5.3, 4.9, 2.4 Hz, 1H, 5'-H), 3.48 – 3.46 (m, 2H, 4'-, 2'-H), 1.85 – 1.68 (m, 2H, 5-H), 1.62 – 1.44 (m, 2H, 7-H), 1.33 – 1.15 (m, 2H, 6-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 178.45 (C-15), 143.95 (C-2), 141.15 (C-9, -21), 134.63 (C-19, -11), 126.47 (C-13, -17), 124.55 (C-3), 121.61 (C-12, -18), 120.88 (C-14, -16), 115.16 (C-10, -20), 102.38 (C-1'), 75.22 (C-5'), 73.03 (C-2'), 70.79 (C-4'), 68.66 (C-3'), 61.71 (C-1), 60.94 (C-6'), 49.86 (C-4), 45.20 (C-8), 29.14 (C-5), 26.01 (C-7), 22.76 (C-6) ppm.

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-(Hepta-*O*-acetyl- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (114)

Ansatz nach AAV 8

LacAc₇- β -Alkin (**101**): 500 mg (0.67 mmol, 1 Äq.) in 5 mL Aceton

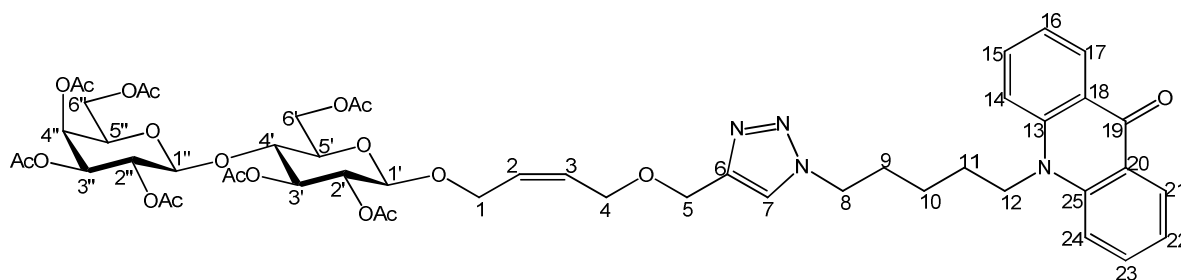
Acr-N₃ (**34**): 205 mg (0.67 mmol, 1 Äq.) in 3 mL Aceton

CuSO₄·5H₂O: 50 mg (0.20 mmol, 0.3 Äq.) in 3 mL H₂O

Na-Ascorbat: 135 mg (0.33 mmol, 0.5 Äq.) in 3 mL H₂O

Ausbeute: 0.27 g (38%), als hellgelber Sirup nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Cy/EE (1:2 ~ 1:8)

R_f = 0.17 (Cy/EE, 1:2)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.60 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.75 (ddd, J = 8.7, 7.0, 1.8 Hz, 2H, 15-, 23-H), 7.57 (s, 1H, 7-H), 7.48 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 14-, 24-H), 7.31 (ddd, J = 7.9, 7.0, 0.8 Hz, 2H, 16-, 22-H), 5.86 – 5.74 (m, 1H, 2-H), 5.74 – 5.62 (m, 1H, 3-H), 5.36 (dd, J = 3.4, 1.0 Hz, 1H, 4'-H), 5.19 (t, J = 9.3 Hz, 1H, 3'-H), 5.12 (dd, J = 10.4, 7.9 Hz, 1H, 2'-H), 4.97 (dd, J = 10.4, 3.5 Hz, 1H, 3''-H), 4.90 (dd, J = 9.5, 7.9 Hz, 1H, 2'-H), 4.65 (s, 2H, 5-H), 4.54 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.53 – 4.51 (m, 1H, 6'-a-H), 4.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1''-H), 4.44 (t, J = 6.9 Hz, 2H, 8-H), 4.39 – 4.30 (m, 3H, 12-, 1a-H), 4.29 – 4.23 (m, 1H, 1b-H), 4.11 – 4.07 (m, 5H, 6''-, 6'-b-, 4-H), 3.91 – 3.86 (m, 1H, 5''-H), 3.81 (t, J = 9.5 Hz, 1H, 4'-H), 3.60 (ddd, J = 9.9, 4.8, 2.1 Hz, 1H, 5'-H), 2.15, 2.13 (s, 3H, COCH₃), 2.11 – 2.07 (m, 2H, 9-H), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 2.06, 2.05, 2.04 (s, 3H, COCH₃), 2.02 – 1.99 (m, 2H, 11-H), 1.97 (s, 3H, COCH₃), 1.65 – 1.55 (m, 2H, 10-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 177.91 (C-19), 170.32, 170.31, 170.09, 170.02, 169.75, 169.60, 169.09 (COCH₃), 145.12 (C-6), 141.66 (C-18, -20), 133.99 (C-15, -23), 129.87 (C-2),

128.45 (C-3), 128.10 (C-17, -21), 122.51 (C-7), 122.44 (C-13, -25), 121.33 (C-16, -22), 114.38 (C-14, -24), 101.09 (C-1''), 99.26 (C-1'), 76.20 (C-4'), 72.85 (C-3'), 72.63 (C-5'), 71.62 (C-2'), 70.99 (C-3''), 70.68 (C-5''), 69.12 (C-2''), 66.61 (C-4''), 65.99 (C-4), 64.71 (C-1), 63.71 (C-5), 61.93 (C-6'), 60.76 (C-6''), 49.92 (C-8), 45.68 (C-12), 30.02 (C-9), 26.62 (C-11), 23.82 (C-10), 21.03, 20.89, 20.79, 20.72, 20.61, 20.49 (COCH₃) ppm.

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-(β -D-Lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-acridin-9(10*H*)-on (115)

Ansatz I nach AAV 7: Entschützung von Lactosid 114

LacAc₇-D-T-P-Acr (114): 200 mg (0.19 mmol)

Ausbeute: 115 mg (80%), als hellgelber Feststoff

Ansatz II nach AAV 8

Lac- β -Alkin (102): 500 mg (1.11 mmol, 1 Äq.) in 5 mL EtOH

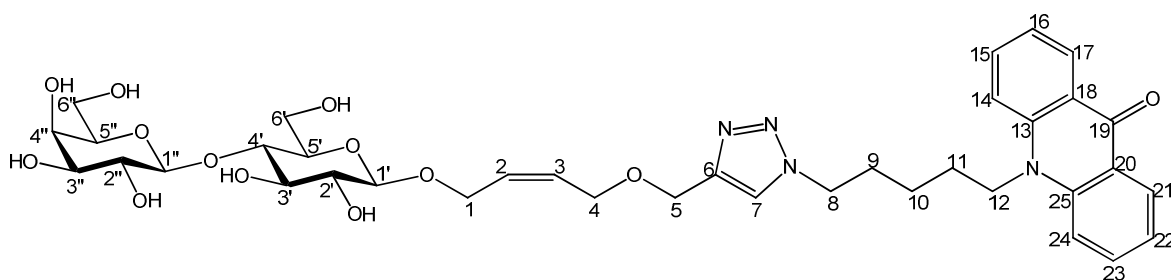
Acr-N₃ (34): 340 mg (1.11 mmol, 1 Äq.) in 3 mL EtOH

CuSO₄·5H₂O: 83 mg (0.33 mmol, 0.3 Äq.) in 3 mL H₂O

Na-Ascorbat: 110 mg (0.55 mmol, 0.5 Äq.) in 3 mL H₂O

Ausbeute: 0.63 g (75%), als hellgelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 4:1)

$R_f = 0.40$ (C/M, 2/1)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 8.45 (dd, J = 1.6, 8.0, 2H, 17-, 21-H.), 8.00 (s, 1H, 7-H), 7.85 – 7.82 (m, 2H, 15-, 23-H), 7.72 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 14-, 24-H), 7.34 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 16-, 22-H), 5.80 – 5.70 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.61 (s, 2H, 5-H), 4.48 – 4.45 (m, 4H, 8- 12-H), 4.40 – 4.38 (m, 1H, 1a-H), 4.37 (d, J = 7.7, 1H, 1'-H), 4.34 (d, J = 7.8, 1H, 1'-H), 4.31 – 4.29 (m, 1H, 1b-H), 4.16 (d, J = 2.8, 2H, 4-H), 3.90 (dd, 1H, 6'-a-H), 3.85 – 3.78 (m, 3H, 6'-b-, 4'-, 6'-a-H), 3.72 – 3.69 (m, 1H, 6'-b-H), 3.60 – 3.49 (m, 5H, 3'-, 2'-, 4'-, 5'-, 3'-H), 3.40 – 3.39 (m, 1H, 5'-H), 3.29 – 3.25 (m, 1H, 2'-H), 2.06 – 2.03 (m, 2H, 9-H), 1.94 – 1.91 (m, 2H, 11-H), 1.57 – 1.54 (m, 2H, 10-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ = 180.16 (C-19), 143.56 (C-6), 136.20 (C-15, -23), 130.76 (C-2, -3), 128.64 (C-17, -21), 123.44 (C-13, -25), 123.11 (C-16, -22), 117.14 (C-14, -24), 105.53 (C-1'), 103.49 (C-1'), 81.16 (C-4'), 77.50 (C-3'), 76.93 (C-5'), 76.89 (C-5'), 75.25 (C-3'), 75.10 (C-2'), 72.97 (C-2'), 70.71 (C-4'), 67.29 (C-4), 65.99 (C-1), 64.47 (C-5), 62.91 (C-6'), 62.41 (C-6'), 51.51 (C-8), 47.19 (C-12), 31.29 (C-9), 28.09 (C-11), 24.87 (C-10) ppm.

10-[5-((4-*O*-(β -D-Glucosyloxy)-methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2*H*-chromen-2-on (116)

Ansatz nach AAV 8

Glc- β -prop (**56**): 100 mg (0.459 mmol, 1 Äq.) in 3.5 mL $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

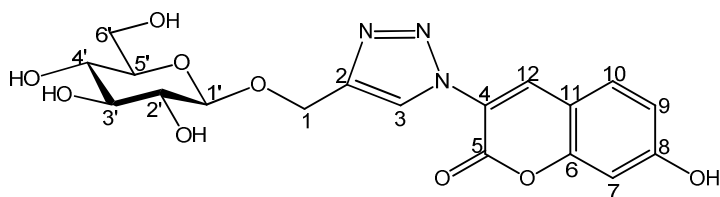
$\text{NEt}_2\text{Coum-N}_3$ (**38**): 93 mg (0.459 mmol, 1 Äq.) in 3.5 mL $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 172 mg (0.688 mmol, 1.5 Äq.) in 3.5 mL H_2O

Na-Ascorbat: 91 mg (0.459 mmol, 1 Äq.) in 3.5 mL H_2O

Ausbeute: 99 mg (45%), als gelbgrüner Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

R_f = 0.19 (C/M, 5:1)



^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 8.57 (s, 1H, 12-H), 8.56 (s, 1H, 7-H), 7.74 (d, J = 8.6 Hz, 1H, 9-H), 6.90 (dd, J = 1.9, 8.5 Hz, 1H, 10-H), 4.90 (d, 1H, J = 1.6 Hz, 3-H), 4.95 (d, J = 12.2 Hz, 1H, 1a-H), 4.74 (d, J = 12.2 Hz, 1H, 1b-H), 4.32 (d, J = 7.7 Hz, 1H, 1'-H), 3.72 (d, 1H, J = 11.2 Hz, 6'a-H), 3.49 (m, 1H, 6'b-H), 3.18 – 3.15 (m, 2H, 3', 5'-H), 3.09 – 3.05 (m, 1H, 4'-H), 3.03 – 2.99 (m, 2H, 2'-H) ppm.

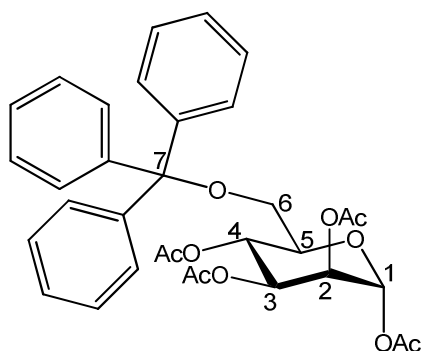
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ = 162.82 (C-5), 156.70 (C-6), 155.01 (C-8), 144.36 (C-7), 136.79 (C-9), 125.61 (C-12), 119.65 (C-11), 114.66 (C-8), 110.66 (C-2), 102.51 (C-1', -3), 77.29 (C-3'), 77.02 (C-5'), 73.74 (C-2'), 70.47 (C-4'), 61.59 (C-6'), 61.51 (C-1) ppm.

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-trityl- α -D-mannopyranosid (117)

Eine Mischung aus 10 g (55.5 mmol, 1 Äq.) Mannose und 18.57 g (66.6 mmol, 1.2 Äq.) Tritylchlorid in 50 mL Pyridin wird bei RT gerührt, bis keine weitere Umsetzung bei DC-Kontrolle (C/M, 5:1) zu beobachten ist (ca. 3 ~ 5 h). Anschließend wird die Mischung mit 29 mL (278 mmol, 5 Äq.) Acetylanhydrid versetzt und bei 0 °C für 1 h und dann weiter bei RT über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung in Eiswasser gegeben und kräftig gerührt. Die entstehenden Niederschläge werden abgesaugt, im Vakuum getrocknet und in EtOH umkristallisiert.

Ausbeute: 13.77 g (42%), als farblose Kristalle

R_f = 0.32 (Cy/EE, 2:1)



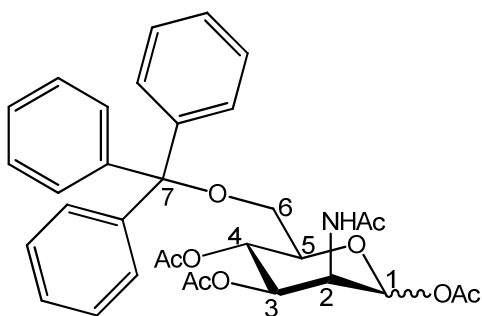
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.46 – 7.44 (m, 6H, H_{ar}), 7.30 – 7.25 (m, 6H, H_{ar}), 7.23 – 7.22 (m, 3H, H_{ar}), 5.86 (d, 1H, J = 1.1 Hz, 1-H), 5.46 (dd, 1H, J = 1.1, 3.2 Hz, 2-H), 5.37 (t, 1H, J = 9.8 Hz, 4-H), 5.06 (dd, 1H, J = 9.9, 3.2 Hz, 3-H), 3.65 (dt, 1H, J = 9.7, 4.5 Hz, 5-H), 3.34 (dd, 1H, J = 2.9, 10.6 Hz, 6a-H), 3.17 (dd, 1H, J = 10.6, 4.65 Hz, 6b-H), 2.23, 2.12, 1.97, 1.75 (COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 171.90, 171.54, 170.75, 170.07 (COCH_3), 145.27, 130.39, 129.40, 128.64 (C_{ar}), 92.17 (C-1), 88.35 (C-7), 76.37 (C-5), 72.58 (C-3), 70.05 (C-2), 67.64 (C-4), 63.91 (C-6), 22.44, 22.40, 22.20 (COCH_3) ppm.

2-Acetamido-2-desoxy-1,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-trityl-D-mannopyranosid (118)

2.0 g (9.04 mmol, 1 Äq.) ManNAc und 5.04 g (18.1 mmol, 2 Äq.) Tritylchlorid werden in 11 mL Pyridin suspendiert und auf 40 °C erhitzt, und weiter über Nacht gerührt, bis keine weitere Umsetzung bei DC-Kontrolle (C/M, 5:1) beobachtet wird. Anschließend wird die Mischung auf 0 °C abgekühlt und mit 4.27 mL (45.2 mmol, 5 Äq.) Essigsäureanhydrid versetzt, und bei 0 °C für 1 h und dann weiter bei RT über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung in Eiswasser eingerührt. Die entstehenden Niederschläge werden abgesaugt, im Vakuum getrocknet und durch Säulenchromatographie mit Cy/EE (1:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 3.34 g (63%), als farblose Kristalle; **118** α : **118** β = 3 : 1



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.36 – 7.34 (m, 6H, $\text{H}_{\text{ar}\alpha}$, $\text{H}_{\text{ar}\beta}$), 7.24 – 7.15 (m, 24H, $\text{H}_{\text{ar}\alpha}$, $\text{H}_{\text{ar}\beta}$), 6.03 (d, J = 1.9 Hz, 1H, $1\alpha\text{-H}$), 5.78 (d, J = 1.7 Hz, 1H, $1\beta\text{-H}$), 5.26 (t, J = 10.1 Hz, 1H, $4\alpha\text{-H}$), 5.23 – 5.20 (m, 2H, $3\alpha\text{-}$, $4\beta\text{-H}$), 4.91 (dd, J = 3.9, 9.8 Hz, 1H, $3\beta\text{-H}$), 4.67 (ddd, J = 9.1, 3.9, 1.6 Hz, 1H, $2\beta\text{-H}$), 4.55 (ddd, J = 9.3, 4.2, 2.0 Hz, 1H, $2\alpha\text{-H}$), 3.84 (ddd, J = 9.8, 3.3, 2.8 Hz, 1H, $5\alpha\text{-H}$), 3.69 (ddd, J = 9.7, 4.0, 2.9 Hz, 1H, $5\beta\text{-H}$), 3.30 – 3.25 (m, 2H, $6\beta\alpha\text{-}$, $6\alpha\alpha\text{-H}$), 3.03 (dd, J = 10.6, 4.1 Hz, 1H, $6\beta\text{b-H}$), 3.29 (dd, J = 10.6, 3.8 Hz, 1H, $6\alpha\text{b-H}$), 2.08, 2.05, 2.03, 2.01, 1.92, 1.91, 1.71, 1.70 (s, 3H, $\text{COCH}_3\alpha+\beta$) ppm.

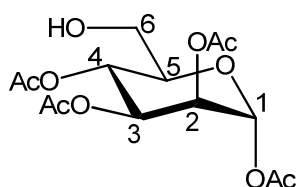
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.93, 170.64, 170.40, 169.56, 168.77, 168.61 ($\alpha+\beta\text{-COCH}_3$), 143.82 ($\text{t-C}_{\text{ar}\alpha}$), 143.81 ($\text{t-C}_{\text{ar}\beta}$), 129.12, 128.24, 127.54 ($\text{C}_{\text{ar}\alpha+\beta}$), 92.19 ($\text{C-1}\alpha$), 91.05 ($\text{C-1}\beta$), 87.25 ($\text{C-7}\alpha$), 87.16 ($\text{C-7}\beta$), 75.17 ($\text{C-5}\beta$), 72.20 ($\text{C-5}\alpha$), 72.10 ($\text{C-3}\beta$), 69.69 ($\text{C-3}\alpha$), 66.15 ($\text{C-4}\alpha$), 66.05 ($\text{C-4}\beta$), 62.20 ($\text{C-6}\beta$), 61.89 ($\text{C-6}\alpha$), 50.08 ($\text{C-2}\beta$), 49.85 ($\text{C-2}\alpha$), 23.84, 23.74, 21.28, 21.21, 21.14, 20.95, 20.91 ($\text{COCH}_3\alpha+\beta$) ppm.

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl - α -D-mannopyranosid (119)

8.35 g (14.1 mmol) $\text{ManAc}_4\text{-6-Tr}$ (117) wird in 35 mL AcOH bei 70 °C gelöst. Anschließend wird die Lösung auf RT gekühlt und mit 3.3 mL HBr (33% in AcOH) versetzt und für 1 min gerührt. Das ausgefallene Tritylbromid wird abfiltriert und das Filtrat in 200 mL Eiswasser eingerührt. Man extrahiert mit CHCl_3 dreimal. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 2.60 g (53%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.07 (Cy/EE, 2:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.88 (d, J = 1.0 Hz, 1H, 1-H), 5.49 (dd, J = 1.0, 3.2 Hz, 1H, 2-H), 5.26 (t, J = 10.0 Hz, 1H, 4-H), 5.19 (dd, J = 10.5, 3.5 Hz, 1H, 3-H), 3.68 (dd, J = 10.6, 2.8 Hz, 1H, 6a-H), 3.58 (dd, J = 10.6, 4.6 Hz, 1H, 6b-H), 3.56 (ddd, J = 2.8, 4.6, 9.8 Hz, 1H, 5-H), 2.14, 2.11, 2.10, 2.07 (COCH_3) ppm.

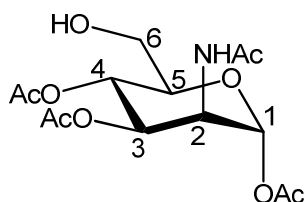
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.57, 170.35, 170.18, 168.8 (COCH_3), 90.74 (C-1), 75.86 (C-5), 71.01 (C-3), 68.68 (C-2), 66.20 (C-4), 61.52 (C-6), 21.22, 21.10, 20.91, 20.9 (COCH_3) ppm.

2-Acetamido-2-desoxy-1,3,4-tri-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (120)

Eine Lösung von 1.0 g (1.696 mmol, 1 Äq.) ManNAcAc₃-6-Tr (**118**) in 15 mL AcOH wird mit 270 μL (4.747 mmol, 3.5 Äq.) HBr (33% in AcOH) bei 0 °C versetzt und für 5 min gerührt. Das ausgefallene Tritylbromid wird abfiltriert und die Mutterlösung wird in 100 mL Eiswasser eingerührt und fünfmal mit CH_2Cl_2 und zweimal mit EE gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.24 g (40%), als farbloser Sirup.

R_f = 0.12 (Cy/EE, 1:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 6.39 (d, 1H, J = 9.1 Hz, NH), 5.78 (d, 1H, J = 1.7 Hz, 1-H), 5.06 – 5.04 (m, 2H, 4-, 3-H), 4.71 (dq, 1H, J = 1.7, 9.1 Hz, 2-H), 3.73 (dd, 1H, J = 1.9, 12.9 Hz, 6a-H), 3.53 – 3.48 (m, 2H, 6b-, 5-H), 2.04, 2.03, 2.02, 1.95 (COCH_3) ppm.

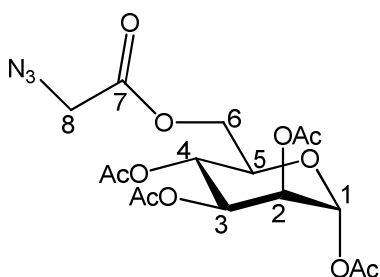
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 176.62, 171.80, 170.65, 169.01 (COCH_3), 90.97 (C-1), 75.77 (C-5), 71.65 (C-3), 66.00 (C-4), 60.93 (C-6), 50.12 (C-2), 23.44, 21.14, 21.12, 21.10 (COCH_3) ppm.

6-(2-Azidoacetoxy)-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (**121**)

Eine Mischung aus 0.5 g (1.301 mmol, 1 Äq.) $\text{ManAc}_4\text{-6-OH}$ (**119**), 263 mg (2.602 mmol, 2 Äq.) Azidoessigsäure (**20**), 158 mg (1.301 mmol, 1 Äq.) DMAP und 537 mg (2.603 mmol, 2 Äq.) DCC in 22 mL DCM* wird bei RT unter Argon als Schutzgas für 1.5 h gerührt, bis eine vollständige Umsetzung zu beobachten ist. Anschließend wird diese Mischung mit 4 mL AcOH/MeOH (1:1) verdünnt und durch Kieselgur abgesaugt. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (3:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.39 g (70%), als farbloser Sirup.

R_f = 0.18 (Cy/EE, 3:2)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.80 (d, 1H, J = 1.1 Hz, 1-H), 5.43 (dd, 1H, J = 1.1, 3.3 Hz, 2-H), 5.24 (t, 1H, J = 9.9 Hz, 4-H), 5.08 (dd, 1H, J = 10.0, 3.3 Hz, 3-H), 4.40 (dd, 1H, J = 5.2, 12.4 Hz, 6a-H), 4.18 (dd, 1H, J = 2.1, 12.4 Hz, 6b-H), 3.85 (m, 2H, 8-H), 3.78 – 3.76 (m, 1H, 5-H), 2.16, 2.04, 1.99, 1.94 (COCH_3) ppm.

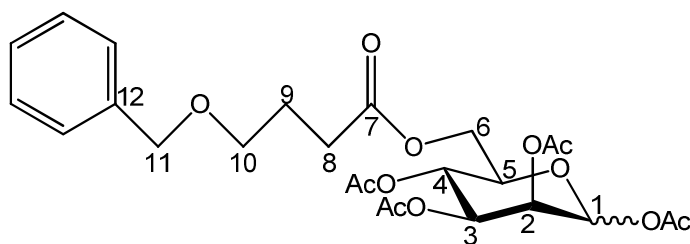
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.51, 170.11, 170.06, 168.72, 168.54 (COCH_3), 90.76 (C-1), 73.46 (C-5), 70.91 (C-3), 68.49 (C-2), 65.54 (C-4), 63.29 (C-6), 50.52 (C-8), 21.08, 21.05, 21.00, 20.87 (COCH_3) ppm.

6-(4-(Benzyloxy) butanoyl)-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (122)

Eine Mischung aus 0.3 g (0.861 mmol, 1 Äq.) ManAc₄-6-OH (119), 167 mg (0.861 mmol, 1 Äq.) Säure (18), 52 mg (0.431 mmol, 0.5 Äq.) DMAP und 355 mg (1.723 mmol, 2 Äq.) DCC in 16 mL DCM* wird bei RT unter Argon als Schutzgas für 1.5 h gerührt, bis eine vollständige Umsetzung zu beobachten ist. Anschließend wird die Mischung mit 3 mL AcOH/MeOH (1:1) verdünnt und durch Kieselgur abgesaugt. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (3:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.27 g (60%), als farbloser Feststoff.

$R_f = 0.18$ (Cy/EE, 3:2)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.34 – 7.31 (m, 5H, H_{ar}), 6.08 (d, 1H, J = 1.9 Hz, 1 α -H), 5.86 (d, 1H, J = 1.1 Hz, 1 β -H), 5.49 (d, 1H, J = 3.3 Hz, 2 β -H), 5.36 – 5.30 (m, 2H, 3 α -, 4 β -H), 5.26 (m, 1H, 2 α -H), 5.13 (dd, 1H, J = 10.0, 3.3 Hz, 3 β -H), 4.49 (m, 2H, 11-H), 4.28 – 4.24 (m, 2H, 6 β a-, 5 α -H), 4.15 – 4.01 (m, 3H, 6 β b-, 6 α -, 4 α -H), 3.79 (ddd, 1H, J = 9.9, 5.3, 2.2 Hz, 5 β -H), 3.48 – 3.47 (m, 2H, 10-H), 2.42 (t, 2H, J = 7.7 Hz, 8-H), 2.21, 2.16, 2.15, 2.10, 2.08, 2.04, 2.01, 1.97 (COCH₃) 1.91 – 1.89 (m, 2H, 9-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 172.55, 172.50, 170.96, 170.55, 170.11, 170.36, 170.30, 170.10, 168.73, 168.43 (CO), 138.64 (C-12), 128.78, 128.01 (C_{ar}), 90.01 (C-1 α), 90.97 (C-1 β), 73.74 (C-5 β), 73.26 (C-11 α -, -11 β), 71.08 (C-4 α), 71.03 (C-3 β), 69.22 (C-10 α -, -10 β), 69.18 (C-3 α), 68.75 (C-2 α), 68.60 (C-2 β), 65.66 (C-4 β), 62.47 (C-6 α -, -6 β), 31.30 (C-8 α -, -8 β), 25.40 (C-9 α -, -9 β), 21.23, 21.12, 21.02, 20.98, 20.87 (COCH₃) ppm.

6-(4-Hydroxybutanoyl)-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (123)

Ansatz nach AAV 5a

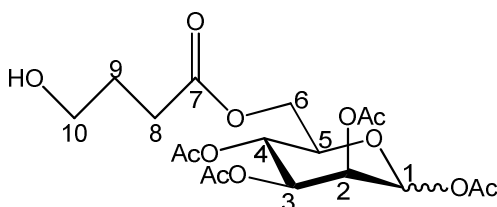
ManAc₄-6-L (122): 273 mg (0.52 mmol)

Pd/C: 36 mg

MeOH*: 5 mL

Ausbeute: 152 mg (61%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EE, 1:2)

$R_f = 0.21$ (Cy/EE, 1:2)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.09$ (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, $1\alpha\text{-H}$), 5.87 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz, $1\beta\text{-H}$), 5.49 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, $2\beta\text{-H}$), $5.37 - 5.36$ (m, 1H, $3\alpha\text{-H}$), 5.31 (t, 1H, $J = 9.9$ Hz, $4\beta\text{-H}$), 5.26 (m, 1H, $2\alpha\text{-H}$), 5.16 (dd, 1H, $J = 10.0, 3.3$ Hz, $3\beta\text{-H}$), $4.34 - 4.29$ (m, 2H, $6\beta\text{-a-}, 5\alpha\text{-H}$), 4.17 (dd, 1H, $J = 12.4, 2.1$ Hz, $6\beta\text{-b-H}$), $4.07 - 4.04$ (m, 1H, $4\alpha\text{-H}$), 3.82 (ddd, 1H, $J = 9.9, 5.3, 2.2$ Hz, $5\beta\text{-H}$), $3.69 - 3.65$ (m, 2H, 10-H), 2.43 (m, 2H, 8-H), $2.22, 2.18, 2.17, 2.11, 2.10, 2.06, 2.04, 2.01$ (COCH_3) $1.89 - 1.85$ (m, 2H, 9-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.30, 171.54, 170.14, 169.87, 169.17, 169.02, 168.83, 168.72, 167.36, 167.06$ (CO), 89.64 (C- 1α), 89.44 (C- 1β), 72.46 (C- 5β), 69.80 (C- 4α), 69.61 (C- 3β), 67.72 (C- 3α), 67.34 (C- 2α), 67.23 (C- 2β), 64.29 (C- 4β), 60.50 (C- $10\alpha, -10\beta$), 59.38 (C- $6\alpha, -6\beta$), 29.63 (C- $8\alpha, -8\beta$), 26.38 (C- $9\alpha, -9\beta$), $20.02, 19.84, 19.77, 19.73, 19.66, 19.61, 19.51$ (COCH_3) ppm.

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (124)

Ansatz nach AAV 3c

GalAc₄-NHCCl₃ (**49**): 0.57 g (1.15 mmol, 1.2 Äq.)

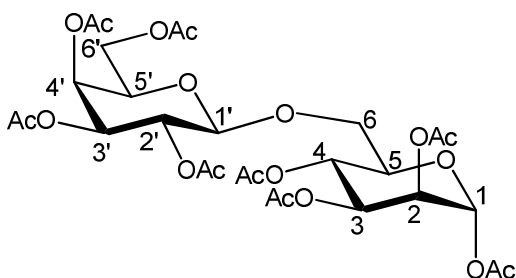
ManAc₄-6-OH (**119**): 0.33 g (0.95 mmol, 1 Äq.)

TMSOTf: 45 μ L (0.24 mmol, 0.25 Äq.) in 2 mL DCM (wasserfrei)

DCM (wasserfrei): 10 mL

Ausbeute: 0.37 g (57%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EE, 1:1)

R_f = 0.56 (Cy/EE, 1:4)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.76 (d, J = 1.1 Hz, 1H, 1-H), 5.39 (dd, J = 1.1, 3.1 Hz, 1H, 2-H), 5.30 (dd, J = 0.9, 3.5 Hz, 1H, 4'-H), 5.15 (dd, J = 10.4, 7.9 Hz, 1H, 2'-H), 5.09 (t, J = 9.7 Hz, 1H, 4-H), 5.03 (dd, J = 9.9, 3.2 Hz, 1H, 3-H), 4.92 (dd, J = 10.4, 3.4 Hz, 1H, 3'-H), 4.44 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.11 – 4.05 (m, 2H, 6'-H), 3.88 (dd, J = 11.5, 2.3 Hz, 1H, 6a-H), 3.82 – 3.79 (m, 1H, 5'-H), 3.67 (ddd, J = 9.5, 6.1, 2.3 Hz, 1H, 5-H), 3.54 (dd, J = 11.5, 6.1 Hz, 1H, 6b-H), 2.14, 2.06, 2.02, 2.01, 1.98, 1.97, 1.92, 1.89 (s, 3H, COCH₃) ppm.

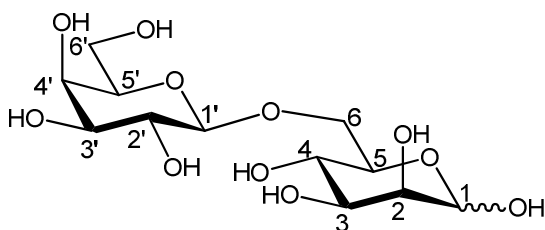
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 169.46, 169.31, 169.28, 169.18, 168.82, 168.76, 168.69, 167.30 (COCH₃), 100.33 (C-1'), 89.35 (C-1), 73.76 (C-5), 69.93 (C-5'), 69.83 (C-3'), 69.77 (C-3), 67.38 (C-2), 67.20 (C-2'), 66.85 (C-6), 66.10 (C-4'), 64.87 (C-4), 60.30 (C-6'), 20.10, 19.85, 19.76, 19.73, 19.71, 19.67, 19.62, 19.59 (COCH₃) ppm.

β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-mannose (126)

Ansatz nach AAV 7

geschütztes Disaccharid **124**: 370 mg (0.545 mmol)

Ausbeute: 170 mg (91%), als farbloser Feststoff; **126** α : **126** β = 2:1



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.10 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 1 α -H), 4.84 (d, J = 0.9 Hz, 1H, 1 β -H), 4.37 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.15 (dd, J = 2.0, 11.3 Hz, 1H, 3 β -H), 4.10 (dd, J = 2.0, 11.3 Hz, 1H, 3 α -H), 3.91 – 3.85 (m, 3H, 5 α -, 4'-, 2 α -H), 3.81 (t, J = 5.5 Hz, 1H, 4 α -H), 3.74 – 3.66 (m, 4H, 6'-, 6 α -H), 3.63 (m, 1H, 5'-H), 3.59 (m, 1H, 3'-H), 3.49 (dd, J = 7.8, 9.9 Hz, 1H, 2'-H) ppm.

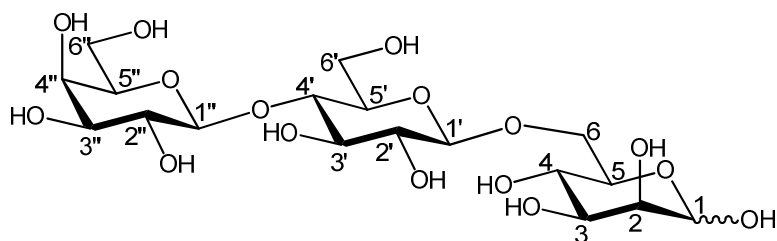
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 103.73 (C-1'), 94.55 (C-1 α), 94.16 (C-1 β), 75.54 (C-5'), 73.01 (C-3'), 71.74 (C-5 α), 71.18 (C-2'), 71.05 (C-4'), 69.22 (C-3 α), 69.03 (C-2 α , -4 α), 67.01 (C-6 α), 66.81 (C-6 β), 61.40 (C-6') ppm.

β -D-Lactosyl-(1 \rightarrow 6)-D-Mannose (127)

Ansatz nach AAV 7

Geschütztes Trisaccharid **125**: 1.71 g (1.77 mmol)

Ausbeute: 616 mg (69%), als farbloser Feststoff; **127** α : **127** β = 2 : 1



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 5.12 (d, J = 1.7 Hz, 1H, $1\alpha\text{-H}$), 4.85 (d, J = 0.8 Hz, 1H, $1\beta\text{-H}$), 4.49 (d, J = 8.0, 5.0 Hz, 1H, $1'\text{-H}$), 4.39 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $1''\text{-H}$), 4.15 (dd, J = 11.4, 1.9 Hz, 1H, $6\beta\text{a-H}$), 4.11 (dd, J = 11.3, 1.8 Hz, 1H, $6\alpha\text{a-H}$), 3.94 – 3.86 (m, 4H, $6''\text{'a-}$, $4''\text{'-}$, $2\alpha\text{-}$, $5\alpha\text{-H}$), 3.84 (dd, J = 9.4, 3.8 Hz, 1H, $6\alpha\text{b-H}$), 3.81 – 3.69 (m, 5H, $3\alpha\text{-}$, $5''\text{'-}$, $6''\text{'b-}$, $6'\text{-H}$), 3.68 – 3.65 (m, 1H, $4\alpha\text{-H}$), 3.64 – 3.58 (m, 3H, $4'\text{-}$, $3''\text{'-}$, $3'\text{-H}$), 3.55 (ddd, J = 9.9, 5.2, 2.3 Hz, 1H, $5'\text{-H}$), 3.49 (dd, J = 10.0, 7.8 Hz, 2H, $2''\text{'-H}$), 3.35 – 3.28 (m, 2H, $2'\text{-H}$) ppm.

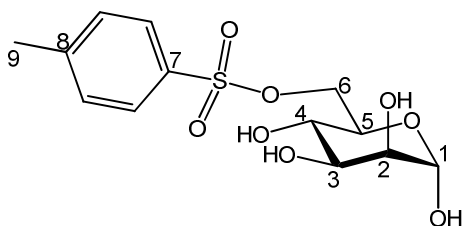
^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 102.95 (C- $1''$ '), 102.53 (C- $1'$ '), 94.11 (C- 1α), 93.75 (C- 1β), 78.40 (C- $4'$ '), 75.35 (C- 4α), 74.75 (C- $5'$ '), 74.22 (C- $3''$ '), 72.82 (C- $2'$ '), 72.53 (C- $3'$ '), 71.34 (C- 2α), 70.96 (C- 5α , $2''$ '), 70.63 (C- $5'$ '), 70.13 (C- 3α), 68.95 (C- 6α), 68.55 (C- $4''$ '), 66.60 (C- 4α), 61.02 (C- $6'$ '), 60.08 (C- $6''$ ') ppm.

6-*O*-Toluolsulfonyl- α -D-mannose (128)

In einer Lösung von 5.0 g (27.8 mmol, 1 Äq.) Mannose in 60 mL Pyridin wird eine Lösung von 7.0 g (36.1 mmol, 1.3 Äq.) TosCl in 10 mL Pyridin bei 0 °C tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird bei RT über Nacht gerührt, bis keine weitere Umsetzung zu beobachten ist. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung mit 18 mL MeOH verdünnt und das Lösungsmittel wird entfernt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie mit C/M (8:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 8.52 g (92%), als gelber Sirup

R_f = 0.54 (C/M, 2:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.83 – 7.80 (m, 2H, H_{ar}), 7.46 (dd, 2H, J = 1.9, 7.9 Hz, H_{ar}), 5.02 (d, 1H, J = 1.6 Hz, 1-H), 4.30 (dd, 1H, J = 1.9, 10.4 Hz, 6a-H), 4.18 (dd, 1H, J = 6.5, 10.4 Hz, 6b-H), 3.78 (ddd, 1H, J = 1.8, 6.4, 9.7 Hz, 5-H), 3.78 (m, 1H, 3-H), 3.72 (dd, 1H, J = 3.3, 9.4 Hz, 2-H), 3.54 (t, 1H, J = 9.7 Hz, 4-H), 2.47 (s, 3H, 9-H) ppm.

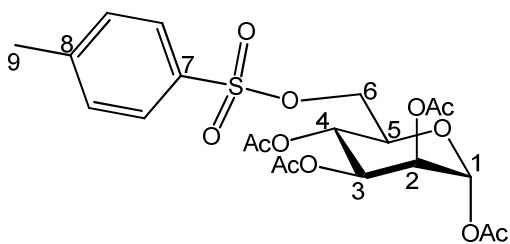
^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 146.86 (C-7), 134.68 (C-8), 131.42, 129.53 (C_{ar}), 96.27 (C-1), 73.14 (C-3), 72.59 (C-2), 72.04 (C-5), 71.78 (C-6), 68.82 (C-4), 21.99 (C-9) ppm.

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- 6-*O*-toluolsulfonyl- α -D-mannopyranosid (129)

In eine Lösung von 5.0 g (27.8 mmol, 1 Äq.) Mannose in 60 mL Pyridin wird eine Lösung von 7.0 g (36.1 mmol, 1.3 Äq.) TosCl in 10 mL Pyridin bei 0 °C tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird bei RT über Nacht gerührt, bis keine weitere Umsetzung auf dem DC (C/M, 2:1) zu beobachten ist. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 21.1 mL (222.5 mmol, 8 Äq.) Essigsäureanhydrid versetzt und weiter bei RT für 3 ~ 7 h gerührt, bis eine vollständige Umsetzung auf dem DC (Cy/EE, 1:2) angezeigt wird. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird mit 60 mL Toluol koevaporiert und dann durch Säulenchromatographie mit Cy/EE (1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 12.3 g (88%), als farbloser Schaum

R_f = 0.71 (Cy/EE, 1:2)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.72 – 7.69 (m, 2H, H_{ar}), 7.27 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H_{ar}), 5.92 (d, 1H, J = 1.8 Hz, 1-H), 5.23 (dd, 1H, J = 3.4, 9.1 Hz, 3-H), 5.15 – 5.13 (m, 2H, 2-, 4-H), 4.08 – 4.04 (m, 2H, 6-H), 3.76 -3.72 (m, 1H, 5-H), 2.37 (s, 3H, 9-H), 2.07, 2.06, 1.96, 1.94 (COCH_3) ppm.

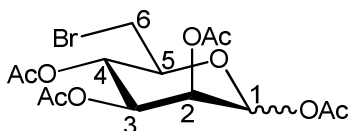
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 171.77, 171.38, 171.33, 169.60 (COCH_3), 146.74 (C-7), 134.29 (C-8), 131.58, 129.79 (C_{ar}), 91.99 (C-1), 72.16 (C-5), 70.25 (C-3), 69.68 (C-4), 69.21 (C-6), 67.54 (C-2), 23.32 (C-9), 22.48, 22.37, 22.25, 22.20 (COCH_3) ppm.

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-bromo-D-mannopyranosid (**130**)

In eine Lösung von 3.0 g (5.97 mmol, 1 Äq.) $\text{ManAc}_4\text{-6-Tos}$ (**129**) in 51 mL DMF^* wird 2.08 g (23.9 mmol, 4 Äq.) LiBr bei RT unter Argon zugegeben. Die Mischung wird auf 56 °C erhitzt und über Nacht gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Et_2O versetzt und mit H_2O zweimal gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedunstet. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie mit Cy/EE (3:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.80 g (73%), als farbloser Schaum

R_f = 0.35 (Cy/EE, 3:2)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 6.04 (d, 1H, J = 1.9 Hz, $1\alpha\text{-H}$), 5.83 (d, 1H, J = 1.1 Hz, $1\beta\text{-H}$), 5.46 (m, J = 1.0, 3.1 Hz, 1H, $2\beta\text{-H}$), 5.28 – 5.23 (m, 2H, $3\alpha\text{-}$, $4\alpha\text{-H}$), 5.20 - 5.18 (m, 2H, $4\beta\text{-}$, $2\alpha\text{-H}$), 5.09 (dd, J = 9.1, 3.1 Hz, 1H, $3\beta\text{-H}$), 3.98 (m, 1H, $5\alpha\text{-H}$), 3.376 (m, 1H, $5\beta\text{-H}$), 3.43 – 3.32 (m, 4H, $6\alpha\text{-}$, $6\beta\text{-H}$), 2.14, 2.10, 2.05, 2.01, 1.97, 1.94 ($\text{COCH}_3\text{-}\alpha\text{-}$, $\beta\text{-}$) ppm.

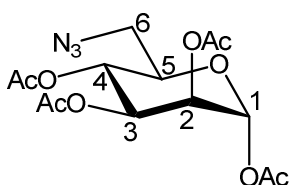
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.87, 170.67, 170.44, 170.26, 170.21, 169.06, 168.68 ($\alpha\text{-}$, $\beta\text{-COCH}_3$), 91.18 (C- 1α), 90.99 (C- 1β), 75.15 (C- 5β), 72.54 (C- 5α), 71.16 (C- 3α), 69.48 (C- 3α), 69.30 (C- 4α), 69.06 (C- 2α), 68.85 (C- 2β), 31.49 (C- 6α), 30.92 (C- 6β), 21.74, 21.51, 21.43, 21.33, 21.23 (COCH_3) ppm.

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-azido- α -D-mannopyranosid (131)

Eine Mischung aus 8.0 g (15.9 mmol, 1 Äq.) ManAc₄-6-Tos (**129**) und 5.175 g (79.6 mmol, 5 Äq.) NaN₃ in 120 mL DMSO wird auf 56 °C erhitzt und bei dieser Temperatur über Nacht gerührt, bis keine weitere Umsetzung (DC-Kontrolle, LM: Cy/EE = 3:1) beobachtet wird. Anschließend wird diese Reaktionsmischung mit 120 mL H₂O verdünnt und mit EE (6 x 120 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie mit Cy/EE (3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 4.19 g (70%), als hellgelber Feststoff

$R_f = 0.21$ (Cy/EE, 3:1)



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.80 (d, 1H, J = 1.9 Hz, 1-H), 5.29 – 5.27 (m, 2H, 3-, 4-H), 5.19 (t, 1H, J = 2.0 Hz, 2-H), 3.95 – 3.92 (m, 1H, 5-H), 3.33 (dd, 1H, J = 2.7, 13.3 Hz, 6a-H), 3.25 (dd, 1H, J = 5.7, 13.5 Hz, 6a-H), 2.12, 2.11, 1.99, 1.94 (COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz): δ = 170.35, 170.02, 169.83, 168.38 (COCH₃), 90.72 (C-1), 72.22 (C-5), 68.94 (C-3), 68.66 (C-2), 66.86 (C-4), 51.09 (C-6), 21.18, 21.09, 21.02, 20.99 (COCH₃) ppm.

6-Azido-D-mannose (132)

Ansatz I

Eine Mischung aus 2.0 g (5.97 mmol, 1 Äq.) Man-6-Tos (**128**) in 35 mL DMF und 1.164 g (17.90 mmol, 3 Äq.) NaN₃ in 6 mL H₂O wird auf 65 °C erhitzt und bei dieser Temperatur über Nacht gerührt, bis keine weitere Umsetzung auf dem DC (C/M, 2:1) beobachtet wird. Dann wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie mit CH₂Cl₂/MeOH (9:1 ~ 8:1) aufgereinigt.

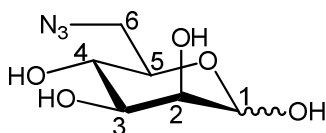
Ausbeute: 0.42 g (34%), als hellgelber Feststoff

Ansatz II nach AAV 7

ManAc₄-6-N₃ (**131**): 2.0 g (5.357 mmol)

Ausbeute: 1.01 g (92%), als gelber Schaum

$R_f = 0.39$ (C/M, 2:1); $R_f = 0.25$ (C/M, 4:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 5.10$ (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, 1 α -H), 4.78 (d, 1H, $J = 0.8$ Hz, 1 β -H), 3.89 (td, 1H, $J = 2.3, 9.4$ Hz, 5 α -H), 3.84 (dd, 1H, $J = 0.8, 3.1$ Hz, 2 β -H), 3.82 (dd, 1H, $J = 1.7, 3.3$ Hz, 2 α -H), 3.76 (dd, 1H, $J = 3.3, 9.4$ Hz, 3 α -H), 3.60 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, 4 α -H), 3.58 – 3.42 (m, 6H, 6 β -, 4 β -, 6 α -, 3 β -H), 3.36 – 3.34 (m, 1H, 5 β -H) ppm;

¹³C NMR (126 MHz): $\delta = 96.27$ (C-1 α), 96.08 (C-1 β), 77.25 (C-5 β), 75.62 (C-3 β), 73.48 (C-5 α), 73.27 (C-2 α), 72.52 (C-3 α), 70.07 (C-4 α), 69.66 (C-4 β), 53.51 (C-6 α), 53.38 (C-6 β) ppm.

1,2,3,4-Tetra-acetyl-6-amino- α -D-mannose (**133**)

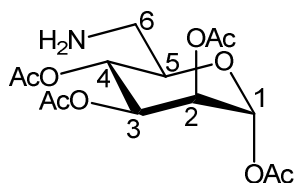
Ansatz nach AAV 5a

ManAc₄-6-N₃ (**131**): 2.0 g (5.357 mmol, 1 Äq.)

Pd/C: 100 mg

THF*: 120 mL

Ausbeute: 1.23 g (66%), als farbloser Schaum nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EE, 1:4)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 6.09 (m, 1H, NH), 5.89 (d, 1H, J = 1.5 Hz, 1-H), 5.21 – 5.17 (m, 2H, 2-, 3-H), 3.94 (dd, 1H, J = 2.7, 8.1 Hz, 6a-H), 3.70 – 3.67 (m, 1H, 5-H), 3.62 (t, 1H, J = 9.8 Hz, 4-H), 3.08 (dd, 1H, 6b-H), 2.08, 2.06, 2.03, 1.99 (COCH_3) ppm.

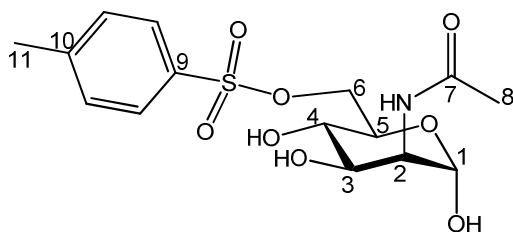
^{13}C NMR (126 MHz): δ = 174.22, 171.87, 171.16, 170.25 (COCH_3), 92.73 (C-1), 75.69 (C-5), 71.30 (C-3), 70.38 (C-2), 66.18 (C-4), 41.35 (C-6), 24.48, 22.49, 22.41, 22.27 (COCH_3) ppm.

2-Acetamido-2-desoxy-6-toluolsulfonyl-D-mannose (134)

In eine Lösung von 2.0 g (9.037 mmol, 1 Äq.) ManNAc in 30 mL Pyridin wird eine Lösung von 6.028 g (31.64 mmol, 3.5 Äq.) TosCl in 15 mL Pyridin bei 0 °C tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird bei 0 °C für 2 h und dann bei RT über Nacht gerührt, bis eine vollständige Umsetzung beobachtet wird. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung mit 40 mL MeOH verdünnt und anschließend das Lösungsmittel abrotiert. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie mit C/M (8:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.82 g (54%), als gelber Sirup

R_f = 0.35 (C/M, 5:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.82 (dd, 2H, J = 2.8, 8.2 Hz, H_{ar}), 7.57 (m, 2H, H_{ar}), 4.97 (d, 1H, J = 1.3 Hz, 1-H), 4.32 (dd, 1H, J = 8.7, 10.4 Hz, 6a-H), 4.24 – 4.20 (m, 2H, 2-, 6b-H),

3.99 – 3.96 (m, 2H, 3-, 5-H), 3.50 (t, 1H, $J = 9.8$ Hz, 4-H), 2.47 (s, 3H, 11-H), 2.01 (s, 3H, 8-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 174.51$ (C-7), 147.01 (C-9), 134.69 (C-10), 131.44 (C_{ar}), 129.52 (C_{ar}), 95.12 (C-1), 71.71 (C-5), 71.25 (C-6), 70.58 (C-3), 68.96 (C-4), 55.57 (C-2), 23.00 (C-8), 21.99 (C-11) ppm.

2-Acetamido-2-desoxy-D-mannopyranosid (135)

Ansatz I

2.444 g (37.5 mmol, 12 Äq.) NaN_3 und 99 mg $t\text{-BuNH}_3 \text{H}_2\text{SO}_4$ werden zu einer Lösung von 1.176 g (3.133 mmol, 1 Äq.) ManNAc-6-Tos (**134**) in 20 mL DMF zugegeben. Diese Mischung wird auf 65 °C erhitzt und gerührt, bis keine weitere Umsetzung zu beobachten ist und anschließend auf RT abgekühlt. Die Reaktionsmischung wird abgesaugt und die Mutterlösung eingeeengt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie mit C/M (10:1) aufgereinigt.

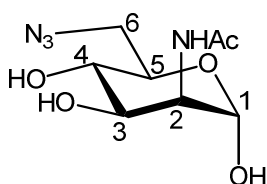
Ausbeute: 0.43 g (56%), als hellgelber Feststoff.

Ansatz II

Eine Mischung aus 700 mg (1.865 mmol, 1 Äq.) ManNAc-6-Tos (**134**) in 15 mL DMF und 1.343 g (5.594 mmol, 3 Äq.) N_3Li (20% in H_2O) wird auf 65 °C erhitzt und bei dieser Temperatur über Nacht gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand durch Säulenchromatographie mit C/M (10:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 419 mg (91%), als hellgelber Feststoff

$R_f = 0.18$ (C/M, 8:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 4.94 (d, 1H, J = 1.7 Hz, 1-H), 5.78 (d, 1H, J = 1.7 Hz, 1-H), 4.14 (d, 1H, J = 4.7 Hz, 2-H), 3.89 (dd, 1H, J = 4.7, 9.6 Hz, 3-H), 3.84 – 3.80 (m, 1H, 5-H), 3.41 – 3.37 (m, 3H, 4-, 6-H), 1.89 (NHCOCH₃) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 174.57 (NHCOCH₃), 95.05 (C-1), 73.65 (C-5), 70.47 (C-3), 70.22 (C-4), 55.80 (C-2), 53.31 (C-6), 22.99 (NHCOCH₃) ppm.

2-*N*-(Benzyloxy)-acetamido-2-desoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (**136**)

ManNH₂·HCl: 2.0 g (9.275 mmol, 1 Äq.)

Acetat (**14**): 2.93 g (11.13 mmol, 1.2 Äq.)

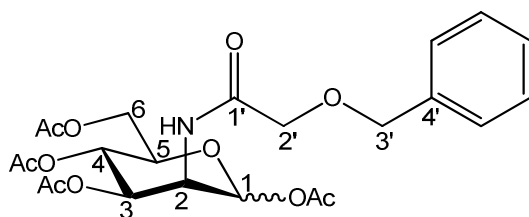
Et₃N: 1.3 mL

MeOH: 56 mL

Die Reaktion wird zuerst nach **AAV 6c** durchgeführt bis die DC-Kontrolle (R_f = 0.65, C/M, 2:1) keine weitere Umsetzung zeigt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand in einer Mischung von 34 mL Pyridin/Essigsäureanhydrid (2:1) gelöst und bei RT für 5 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über eine Kieselgelsäule mit Cy/EE (3:2) gereinigt.

Ausbeute: 2.586 g (57%), als farbloser Feststoff (**136** α : **136** β = 1.6:1)

R_f = 0.41 (Cy/EE, 1:2)



^1H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.32 – 7.26 (m, 10H, H_{ar} α , H_{ar} β), 6.94 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NH β), 6.81 (d, J = 9.6 Hz, 1H, NH α), 5.96 (d, J = 1.7 Hz, 1H, 1 α -H), 5.84 (d, J = 1.6 Hz,

1H, 1 β -H), 5.27 (dd, J = 10.1, 4.3 Hz, 1H, 3 α -H), 5.18 (t, J = 10.1 Hz, 1H, 4 α -H), 5.12 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 4 β -H), 5.01 (dd, J = 9.7, 3.9 Hz, 1H, 3 β -H), 4.71 (ddd, J = 9.4, 3.9, 1.6 Hz, 1H, 2 β -H), 4.59 – 4.52 (m, 3H, 2 α -, 2'-H), 4.14 – 4.10 (m, 2H, 6 α -, 6 β a-H), 4.04 – 3.95 (m, 5H, 6 α b-, 5-, 6 β b-, 3'-H), 3.75 (dq, J = 7.5, 4.3, 2.7 Hz, 1H, 5 β -H), 2.11, 2.04, 2.01, 2.00, 1.92, 1.91, 1.87, 1.84 (s, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.92, 170.79, 170.49, 170.19, 169.89, 169.85 (COCH₃), 168.76 (C-1' β), 168.52 (C-1' α), 137.05 (C-4' β), 136.86 (C-4' α), 129.15 (C_{ar} α), 129.10 (C_{ar} β), 128.77 (C_{ar} α), 128.70 (C_{ar} β), 128.33 (C_{ar} α), 128.24 (C_{ar} β), 91.99 (C-1 α), 90.84 (C-1 β), 74.08 (C-2' α), 73.93 (C-2' β), 73.68 (C-5 β), 71.77 (C-3 β), 70.61 (C-5 α), 69.69 (C-3' β), 69.55 (C-3' α), 69.39 (C-3 α), 65.62 (C-4 α), 65.52 (C-4 β), 62.10 (C-6 α -, -6 β), 49.32 (C-2 β), 49.04 (C-2 α), 21.22, 21.14, 21.11, 21.06, 21.04, 21.01, 20.85, 20.78 (COCH₃) ppm.

2-*N*-(4-Benzoyloxybutoxy)acetamido-2-desoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (137)

ManNH₂·HCl: 300 mg (1.375 mmol, 1 Äq.)

Acetat (**19**): 553 mg (1.65 mmol, 1.2 Äq.)

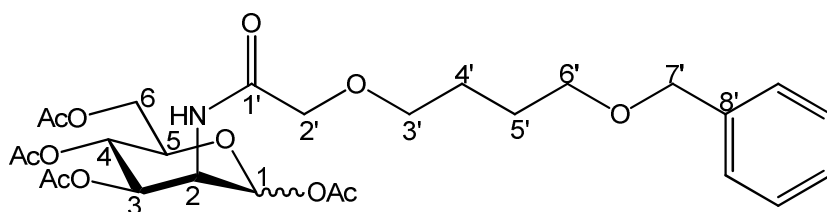
Et₃N: 0.23 mL

MeOH: 10 mL

Die Reaktion wird zuerst nach **AAV 6c** durchgeführt bis die DC-Kontrolle (C/M, 2:1) keine weitere Umsetzung zeigt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand in einer Mischung von 6 mL Pyridin/Essigsäureanhydrid (2:1) gelöst und bei RT für 5 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über eine Kieselgelsäule mit Cy/EE (3:2) chromatographiert.

Ausbeute: 640 mg (82%), als farbloser Feststoff (**137** α : **137** β = 2:1)

R_f = 0.20 (Cy/EE, 1:2)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.27 – 7.20 (m, 10H, $\text{H}_{\text{ar}}\alpha$, $\text{H}_{\text{ar}}\beta$), 6.85 (d, J = 9.5 Hz, 1H, $\text{NH}\beta$), 6.77 (d, J = 9.6 Hz, 1H, $\text{NH}\alpha$), 5.97 (d, J = 1.7 Hz, 1H, $1\alpha\text{-H}$), 5.82 (d, J = 1.7 Hz, 1H, $1\beta\text{-H}$), 5.27 (dd, J = 10.1, 4.3 Hz, 1H, $3\alpha\text{-H}$), 5.13 (t, J = 10.1 Hz, 1H, $4\alpha\text{-H}$), 5.08 (t, J = 9.6 Hz, 1H, $4\beta\text{-H}$), 5.00 (dd, J = 9.7, 3.9 Hz, 1H, $3\beta\text{-H}$), 4.69 (ddd, J = 9.3, 3.8, 1.7 Hz, 1H, $2\beta\text{-H}$), 4.58 (ddd, J = 9.6, 4.3, 1.9 Hz, 1H, $2\alpha\text{-H}$), 4.43 (d, J = 1.7 Hz, 1H, $2'\text{-H}$), 4.16 (dd, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H, $6\alpha\text{-H}$, $6\beta\text{-H}$), 4.06 – 4.02 (m, 2H, $6\alpha\text{-H}$, $6\beta\text{-H}$), 4.00 – 3.95 (m, 1H, $5\alpha\text{-H}$), 3.75 (ddd, J = 9.4, 4.8, 2.1 Hz, 1H, $5\beta\text{-H}$), 3.53 – 3.43 (m, 12H, $3'$, $6'$, $7'\text{-H}$), 2.11, 2.01, 2.00, 1.99, 1.98, 1.97, 1.94, 1.92 (s, 3H, COCH_3), 1.71 – 1.64 (m, 8H, $4'\alpha\text{-H}$, $4'\beta\text{-H}$, $5'\alpha\text{-H}$, $5'\beta\text{-H}$) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 171.18, 170.88, 170.86, 170.56, 170.49, 169.90, 169.84, 168.77, 168.52 (NHCO , COCH_3), 138.86 ($\text{C-8}'\alpha$), 128.75, 127.99, 127.97, 127.94 ($\text{C}_{\text{ar}}\beta$, $\text{C}_{\text{ar}}\alpha$), 92.05 ($\text{C-1}\alpha$), 90.86 ($\text{C-1}\beta$), 73.74 ($\text{C-5}\beta$), 73.30 ($\text{C-2}'\alpha$), 72.12 ($\text{C-3}'\alpha$), 71.16 ($\text{C-3}\beta$), 70.61 ($\text{C-5}\alpha$), 70.44 ($\text{C-3}\beta$), 70.27 ($\text{C-6}'\beta$), 70.13 ($\text{C-6}'\alpha$), 70.17 ($\text{C-7}'$), 69.40 ($\text{C-3}\alpha$), 65.66 ($\text{C-4}\alpha$), 65.24 ($\text{C-4}\beta$), 62.24 ($\text{C-6}\alpha$), 62.21 ($\text{C-6}\beta$), 49.29 ($\text{C-2}\beta$), 49.06 ($\text{C-2}\beta$), 26.83 ($\text{C-4}'\alpha$), 26.81 ($\text{C-4}'\beta$), 26.70 ($\text{C-5}'\alpha$), 26.64 ($\text{C-5}'\beta$), 21.22, 21.13, 21.10, 21.06, 21.03, 20.99 (COCH_3) ppm.

2-*N*-Glycolylamido-2-desoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (138)

Ansatz nach AAV 5a

ManAc₄NGc-Bn (136): 2.586 g (5.32 mmol)

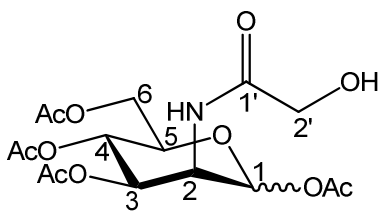
Pd/C: 0.367 g

H₂-Atmosphäre

MeOH*: 40 mL

Ausbeute: 2.0 g (93%), als farbloser Schaum

$R_f = 0.06$ (Cy/EE, 1:2)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.98$ (m, 2H, $\text{NH}\beta$, $\text{NH}\alpha$), 5.97 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, $1\alpha\text{-H}$), 5.83 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, $1\beta\text{-H}$), 5.28 (dd, $J = 10.1, 4.3$ Hz, 1H, $3\alpha\text{-H}$), 5.15 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H, $4\alpha\text{-H}$), 5.07 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, $4\beta\text{-H}$), 5.02 (dd, $J = 9.8, 3.8$ Hz, 1H, $3\beta\text{-H}$), 4.71 (ddd, $J = 11.0, 3.8, 1.6$ Hz, 1H, $2\beta\text{-H}$), 4.59 (ddd, $J = 9.5, 4.3, 1.8$ Hz, 1H, $2\alpha\text{-H}$), 4.17 – 3.98 (m, 7H, $6\alpha\text{-H}$, $6\alpha\text{-H}$, $6\beta\text{-H}$, $6\beta\text{-H}$, $2'\text{-H}$, $5\alpha\text{-H}$), 3.79 – 3.76 (m, 1H, $5\beta\text{-H}$), 2.15, 2.12, 2.04, 2.03, 2.00, 1.94, 1.93 (s, 3H, COCH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.22$ (C-1' α), 172.80 (C-1' β), 171.34, 171.10, 170.56, 170.26, 168.88, 168.65 (COCH_3), 92.19 (C-1 α), 92.00 (C-1 β), 73.70 (C-5 β), 71.86 (C-3 β), 70.66 (C-5 α), 69.41 (C-3 α), 65.88 (C-4 α), 65.72 (C-4 β), 62.79 (C-6 β), 62.44 (C-2' α), 62.33 (C-2' β), 62.25 (C-6 α), 51.12 (C-2 β), 50.84 (C-2 α), 21.24, 21.15, 21.09, 21.04, 21.01, (COCH_3) ppm.

2-*N*-(4-Hydroxybutoxy)acetamido-2-desoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (139)

Ansatz nach AAV 5a

ManNH-L-Bn (137): 370 mg (0.652 mmol)

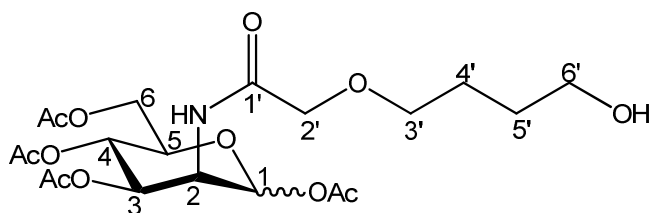
Pd/C: 52 mg

H_2 -Atmosphäre

MeOH*: 6 mL

Ausbeute: 260 mg (84%), als fester Sirup nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 6:1); (139 α : 139 β = 2:1)

$R_f = 0.04$ (Cy/EE, 1:2); $R_f = 0.62$ (C/M, 5:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.95 - 6.98$ (m, 2H, $\text{NH}\beta$, $\text{NH}\alpha$), 5.98 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, $1\alpha\text{-H}$), 5.82 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, $1\beta\text{-H}$), 5.28 (dd, $J = 10.2, 4.4$ Hz, 1H, $3\alpha\text{-H}$), 5.15 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H, $4\alpha\text{-H}$), 5.08 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, $4\beta\text{-H}$), 5.02 (dd, $J = 9.9, 3.9$ Hz, 1H, $3\beta\text{-H}$), 4.71 (ddd, $J = 9.5, 3.9, 1.7$ Hz, 1H, $2\beta\text{-H}$), 4.58 (ddd, $J = 9.4, 4.4, 1.8$ Hz, 1H, $2\alpha\text{-H}$), 4.24 – 4.20 (m, 2H, $6\alpha\text{-H}$, $6\beta\text{-H}$), 4.08 – 4.01 (m, 2H, $6\alpha\text{-H}$, $6\beta\text{-H}$), 4.00 – 3.90 (m, 5H, $5\alpha\text{-H}$, $2'\alpha\text{-H}$, $2'\beta\text{-H}$), 3.76 (ddd, $J = 9.4, 4.8, 2.1$ Hz, 1H, $5\beta\text{-H}$), 3.65 – 3.62 (m, 4H, $6'\alpha\text{-H}$, $6'\beta\text{-H}$), 3.56 – 3.54 (m, 4H, $3'\alpha\text{-H}$, $3'\beta\text{-H}$), 2.11, 2.04, 2.03, 2.00, 1.94, 1.93 (s, 3H, COCH_3), 1.71 – 1.66 (m, 4H, $4'\alpha\text{-H}$, $4'\beta\text{-H}$), 1.65 – 1.62 (m, 4H, $5'\alpha\text{-H}$, $5'\beta\text{-H}$) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.19, 170.97, 170.68, 170.41, 170.37, 170.28, 170.20, 168.76, 168.50$ (NHCO , COCH_3), 92.01 (C- 1α), 90.97 (C- 1β), 73.76 (C- 5β), 72.26 (C- $3'\alpha$, - $3'\beta$), 71.70 (C- 3β), 70.51 (C- 5α), 70.41 (C- $2'\beta$, $2'\alpha$), 69.26 (C- 3α), 65.92 (C- 4α), 65.76 (C- 4β), 62.79 (C- $6'\alpha$), 62.75 (C- $6'\beta$), 62.28 (C- 6α), 62.23 (C- 6β), 49.39 (C- 2β), 49.24 (C- 2β), 30.05 (C- $5'\alpha$, - $5'\beta$), 26.64 (C- $4'\alpha$), 26.58 (C- $4'\beta$), 21.21, 21.13, 21.07, 21.03 (COCH_3) ppm.

2-*N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosy)oxy-acetamido-2-desoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannospyranosid (140)

Ansatz nach AAV 3c

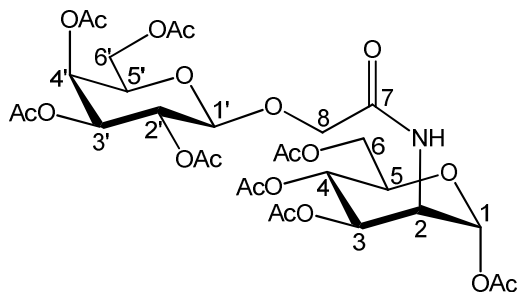
GalAc₄-NHCCl₃ (**49**): 729 mg (1.48 mmol, 2 Äq.)

ManAc₄-NGc (**138**): 300 mg (0.74 mmol, 1 Äq.)

AgOTf: 190 mg (0.74 mmol, 1 Äq.)

DCM*: 20 mL

Ausbeute: 147 mg (27%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EE, 1:1)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 6.73 (m, 1H, NH), 5.89 (d, J = 1.8 Hz, 1H, 1-H), 5.36 (dd, J = 0.8, 3.4 Hz, 1H, 4'-H), 5.29 (dd, J = 10.0, 4.5 Hz, 1H, 3-H), 5.20 (dd, J = 5.3, 7.8 Hz, 1H, 2'-H), 5.14 (t, J = 10.0 Hz, 1H, 4-H), 5.01 (dd, J = 10.6, 3.5 Hz, 1H, 3'-H), 4.60 (ddd, J = 9.8, 4.5, 1.8 Hz, 1H, 2-H), 4.44 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.39 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 8a-H), 4.32 (dd, J = 12.2, 6.6 Hz, 1H, 6a-H), 4.15 – 4.01 (m, 4H, 6b-, 6'-, 5-H), 3.94 – 3.92 (m, 1H, 8b-H), 3.90 (td, J = 10.8, 6.5 Hz, 1H, 5'-H), 2.12, 2.11, 2.03, 2.02, 2.01, 1.99, 1.97, 1.93 (s, 3H, COCH_3) ppm.

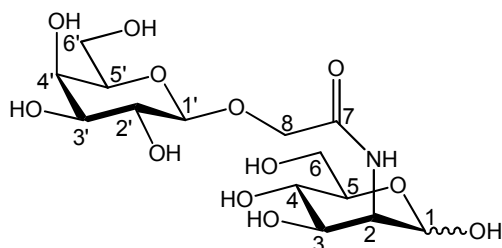
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 170.98 (C-7), 170.71, 170.67, 170.53, 170.34, 169.88, 168.87, 168.57 (COCH_3), 101.52 (C-1'), 92.07 (C-1), 71.51 (C-5'), 70.97 (C-5), 70.55 (C-3'), 69.23 (C-2'), 69.08 (C-3), 68.48 (C-8), 67.17 (C-4'), 66.57 (C-4), 63.27 (C-6), 61.53 (C-6'), 49.09 (C-2), 21.24, 21.16, 21.08, 21.03, 21.00, 20.89, 20.74 (COCH_3) ppm.

2-N-(β-D-Galactopyranosyl)oxyacetamido-2-desoxy-D-mannospyranosid (141)

Ansatz nach AAV 7

Entschützung von Disaccharid **140** (84 mg in 5 mL MeOH)

Ausbeute: 43 mg (94%), als farbloser Feststoff



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 4.98 (d, J = 1.5 Hz, 1H, 1-H), 4.21 – 4.18 (m, 4H, 8-, 2-, 1'-H), 3.95 (dd, J = 9.6, 4.4 Hz, 1H, 3-H), 3.74 – 3.68 (m, 5H, 6'a-, 4'-, 5-, 6-H), 3.62 (m, 1H, 6'b-H), 3.56 (t, J = 9.7 Hz, 1H, 4-H), 3.49 (dd, J = 9.7, 7.7 Hz, 1H, 2'-H), 3.45 (m, 1H, 5'-H), 3.42 (dd, J = 9.7, 3.3 Hz, 1H, 3'-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 173.62 (C-7), 106.06 (C-1'), 94.87 (C-1), 77.47 (C-5'), 75.21 (C-3'), 74.08 (C-5), 72.75 (C-2'), 70.87 (C-3), 70.80 (C-4'), 69.97 (C-8), 68.81 (C-4), 62.89 (C-6'), 62.71 (C-6), 55.38 (C-2) ppm.

Benzyl- α -D-mannopyranosid (142)

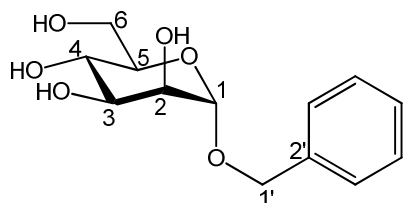
Ansatz nach AAV 3d

Mannose: 5 g (27.75 mmol, 1 Äq.)

Benzylalkohol: 143 mL (1.388 mol, 50 Äq.)

TMSCl : 35 mL (277 mmol, 10 Äq.)

Ausbeute: 2.075 g (81%), als rötlicher Schaum

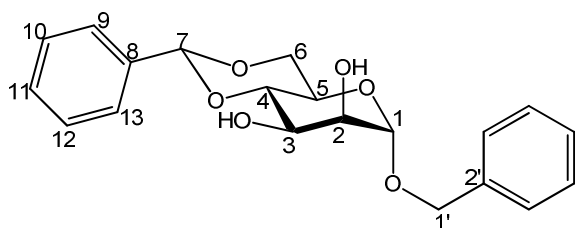


^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.40 (m, 2H, H_{ar}), 7.28 (m, 3H, H_{ar}), 4.86 (d, 1H, J = 1.6 Hz, 1 α -H), 4.76 (d, 1H, J = 11.8 Hz, 1'a-H), 4.54 (dd, 1H, J = 4.4, 11.6 Hz, 1'b-H), 3.87 (dd, 1H, J = 2.2, 7.9 Hz, 6a-H), 3.86 – 3.85 (m, 1H, 2-H), 3.77 – 3.75 (m, 2H, 3-, 6b-H), 3.66 (t, 1H, J = 9.8 Hz, 4-H), 3.65 – 3.62 (m, 1H, 5-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 137.46 (C-2'), 127.88, 127.60, 127.26 (C_{ar}), 99.15 (C-1 α), 73.31 (C-5), 71.13 (C-3), 70.67 (C-2), 68.40 (C-1'), 67.11 (C-4), 61.39 (C-6) ppm.

Benzyl-4,6-*O*-(phenylmethandiyl)- α -D-mannopyranosid (143)

In eine Lösung von Man- α -Bn (142) (4 g, 14.8 mmol, 1 Äq.) in 33 mL DMF werden 3.33 mL (22.2 mmol, 1.5 Äq.) $\text{PhCH}(\text{OMe})_2$ und 0.28 g (1.48 mmol, 0.1 Äq.) TosOH zugegeben. Diese Mischung wird bei 60 °C gerührt, bis keine weitere Umsetzung beobachtet wird. Nach Abkühlen wird die Mischung mit ges. NaHCO_3 -Lösung versetzt, um den pH-Wert auf 7 einzustellen. Danach werden 90 mL EE/ NaHCO_3 (5:4) zugegeben. Die organische Phase wird abgetrennt, mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (1:1) aufgereinigt. Man erhält 1.63 g (31%) Produkt als hellbraunen Feststoff.



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.40 (m, 2H, Har), 7.28 (m, 8H, Har), 5.46 (s, 1H, 7-H), 4.84 (d, 1H, J = 1.3 Hz, 1-H), 4.64 (d, 1H, J = 11.8 Hz, 1'a-H), 4.43 (d, 1H, J = 11.9 Hz, 1'b-H), 4.16 (dd, 1H, J = 4.2, 9.7 Hz, 6a-H), 4.01 (dd, 1H, J = 3.6, 9.3 Hz, 3-H), 3.95 (dd, 1H, J = 1.4, 3.5 Hz, 2-H), 3.84 (t, 1H, J = 9.1 Hz, 4-H), 3.80 – 3.74 (m, 2H, 6b-, 5-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 137.60 (C-8), 137.33 (C-2'), 129.68, 128.99, 128.86, 128.75, 128.67, 128.44 (C_{ar}), 102.66 (C-7), 99.89 (C-1), 79.32 (C-4), 71.41 (C-2), 69.84 (C-1'), 69.21 (C-6), 69.06 (C-3), 63.72 (C-5) ppm.

***N*-Bromoacetyl-D-mannosamin (ManNAcBr) (144)**

Ansatz nach AAV 6c

ManNH₂·HCl: 500 mg (2.32 mmol, 1 Äq.)

Acetat (**22**): 657 mg (2.78 mmol, 1.2 Äq.)

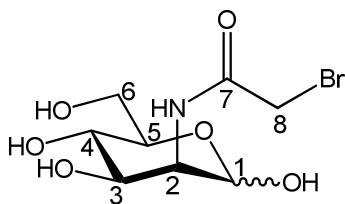
Et₃N: 323 µL

NaOMe: 125 mg (2.32 mmol, 1 Äq.)

MeOH*: 14 mL

Ausbeute: 597 mg (86%), als gelblicher Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

$R_f = 0.25$ (C/M, 4:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.10 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 1 α -H), 4.29 (dd, J = 4.4, 1.6 Hz, 1H, 2 α -H), 4.14 (s, 2H, 8 α -H), 4.29 (dd, J = 4.4, 4.7 Hz, 1H, 3 α -H), 3.87 – 3.81 (m, 2H, 5 α -, 6 α -H), 3.80 – 3.77 (m, 1H, 6 α b-H), 3.69 (t, J = 9.9 Hz, 1H, 4 α -H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 171.4 (C-7 α), 96.2 (C-1 α), 72.20 (C-5 α), 72.2 (C-3 α), 64.0 (C-4 α), 63.9 (C-6 α), 57.2 (C-2 α), 45.0 (C-8 α) ppm.

***N*-Glycolyl-D-mannosamin (ManNGc) (145)**

Ansatz nach AAV 6b

ManNH₂·HCl: 2 g (9.276 mmol, 1 Äq.)

Glycosäure: 0.706 g (9.276 mmol, 1 Äq.)

Et₃N: 1.5 mL (10.821 mmol, 1.2 Äq.)

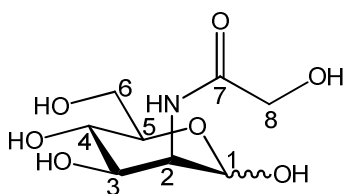
HOBt: 1.398 g (10.204 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 1.724 mL (11.123 mmol, 1.2 Äq.)

DMF*: 40 mL

Ausbeute: 1.98 g (90%), als hellgelber Schaum nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 2:1)

$R_f = 0.25$ (C/M, 2:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.10 (d, 1 H, J = 1.6 Hz, 1 α -H), 5.02 (d, 1H, J = 1.7 Hz, 1 β -H), 4.43 (dd, 1 H, J = 1.7, 4.4 Hz, 2 β -H), 4.30 (dd, 1H, J = 1.6, 4.7 Hz, 2 α -H), 4.13 (s, 2 H, 8 α -H), 4.09 (s, 2 H, 8 β -H), 4.03 (dd, 1 H, J = 4.7, 9.9 Hz, 3 α -H), 3.85 (dd, 1 H, J = 2.3, 12.2 Hz, 6 β a-H), 3.81-3.77 (m, 4 H, 5 α -H, 6 α -H, 3 β -H), 3.73 (dd, 1 H, J = 5.4, 12.5 Hz, 6 β b-H), 3.56 (t, 1 H, J = 9.9 Hz, 4 α -H), 3.46 (t, 1H, J = 9.8 Hz, 4 β -H), 3.38 (ddd, 1 H, J = 2.2, 5.2, 9.9 Hz, 5 β -H) ppm;

¹³C NMR (126 MHz): δ = 176.0 (C-7 β), 175.1 (C-7 α), 92.9 (C-1 α,β), 76.5 (C-5 β), 72.1, 72.0 (C-3 β , 5 α), 68.8 (C-3 α), 66.8, 66.6 (C-4 α,β), 61.0, 60.9 (C-8 α,β), 60.5, 60.4 (C-6 β,α), 53.8 (C-2 β), 52.9 (C-2 α) ppm.

N-Azidoacetyl-D-mannosamin (ManNAcN₃) (146)

Ansatz I nach AAV 6b

ManNH₂·HCl: 2 g (9.276 mmol, 1 Äq.)

Azido-essigsäure (**20**): 1.405 g (13.9 mmol, 1.5 Äq.)

Et₃N: 1.5 mL

HOBt: 1.379 g (10.20 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 1.723 mL (11.12 mmol, 1.2 Äq.)

DMF*: 60 mL

Ausbeute: 2.186 g (90%), als farbloser Schaum nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

Ansatz II nach AAV 6c

ManNH₂·HCl: 362 mg (1.68 mmol, 1 Äq.)

Acetat (**21**): 500 mg (2.52 mmol, 1.5 Äq.)

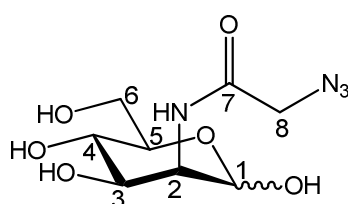
Et₃N: 240 µL (1.73 mmol, 1 Äq.)

NaOMe: 101 mg (1.85 mmol, 1.1 Äq.)

MeOH*: 10 mL

Ausbeute: 0.29 g (66%), als gelblicher Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

$R_f = 0.52$ (C/M, 2:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.10 (d, J = 1.5 Hz, 1H, 1 α -H), 5.00 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 1 β -H), 4.45 (dd, J = 4.4, 1.5 Hz, 1H, 2 β -H), 4.32 (dd, J = 4.6, 1.5 Hz, 1H, 2 α -H), 4.08 – 4.00 (m, 5H, 8 α -, 8 β -, 3 α -H), 3.86 – 3.77 (m, 5H, 6 α -, 5 α -, 3 β -, 6 β a-H), 3.75 (dd, J = 12.3, 5.1 Hz, 1H, 6 β b-H), 3.56 (t, J = 9.8 Hz, 1H, 4 α -H), 3.45 (t, J = 9.8 Hz, 1H, 4 β -H), 3.42 – 3.34 (m, 1H, 5 β -H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 171.83 (C-7 β), 170.94 (C-7 α), 92.91 (C-1 α), 92.82 (C-1 β), 76.38 (C-5 β), 72.02 (C-5 α), 71.97 (C-3 β), 68.81 (C-3 α), 66.75 (C-4 α), 66.52 (C-4 β), 60.41 (C-6 α), 60.39 (C-6 β), 54.27 (C-2 β), 53.37 (C-2 α), 51.72 (C-8 α), 51.64 (C-8 β) ppm.

N-Hex-5-ynoyl-D-mannosamin (ManNHex) (147)

Ansatz nach AAV 6b

ManNH $_2$ ·HCl: 2 g (9.276 mmol, 1 Äq.)

5- Hexinsäure: 1.26 mL (11.13 mmol, 1.2 Äq.)

Et $_3$ N: 1.5 mL

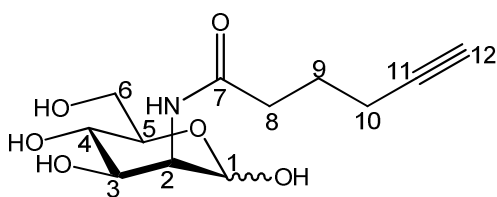
HOBt: 1.379 g (10.20 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 1.723 mL (11.12 mmol, 1.2 Äq.)

DMF*: 80 mL

Ausbeute: 1.979 g (78%), als hellgelber Schaum nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

R_f = 0.26 (C/M, 4:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 5.02 (d, 1H, J = 1.5 Hz, 1 α -H), 4.90 (d, 1H, J = 1.5 Hz, 1 β -H), 4.42 (dd, 1H, J = 2.2, 4.5 Hz, 2 β -H), 4.31 (dd, 1H, J = 2.2, 4.4 Hz, 2 α -H), 4.02 (dd, 1H, J = 4.8, 10.2 Hz, 3 α -H), 3.87-3.84 (m, 3H, 6 β -, 6 α -Ha), 3.81-3.77 (m, 2H, 5 α -H, 6 α -Hb), 3.67 (dd, 1H, J = 4.4, 10.1 Hz, 3 β -H), 3.61 (t, 1H, J = 9.8 Hz, 4 α -H), 3.51 (t, 1H, J = 9.4 Hz, 4 β -H), 3.27 (t, 1H, J = 3.4 Hz, 5 β -H), 2.48-2.40 (m, 4H, 8 α -, 8 β -H), 2.30-2.24 (m, 6H, 10 α -, 12 α -, 10 β -, 12 β -H), 1.88-1.81 (m, 4 H, 9 α -, 9 β -H) ppm;

^{13}C NMR (126 MHz): δ = 177.6 (C-7 β), 176.6 (C-7 α), 95.4 (C-1 α,β), 84.8 (C-11 α,β), 78.7 (C-5 β), 74.9 (C-3 β), 73.9 (C-5 α), 71.0 (C-3 α), 70.4 (C-12 α,β), 68.9 (C-4 α), 68.6 (C-4 β), 62.7 (C-6 α), 62.5 (C-6 β), 56.2 (C-2 β), 55.5 (C-2 α), 36.2 (C-8 α,β), 26.4 (C-9 α), 26.3 (C-9 β), 19.1 (C-10 α,β) ppm.

***N*-Phenylacetyl-D-mannosamin (ManNPhAc) (148)**

Ansatz nach AAV 6c

ManNH₂·HCl: 1.0 g (4.638 mmol, 1 Äq.)

Phenyllessigsäureanhydrid: 0.736 mL (5.565 mmol, 1.2 Äq.)

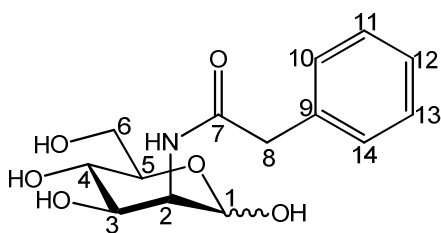
Et₃N: 0.643 mL

NaOMe: 275 mg (5.101 mmol, 1.1 Äq.)

MeOH*: 35 mL

Ausbeute: 0.72 g (53%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

R_f = 0.18 (C/M, 5:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.37 – 7.31 (m, 4H, 10-, 14-, 11-, 13-H), 7.25 – 7.21 (m, 1H, 11-H), 5.03 (d, J = 1.5 Hz, 1H, 1 α -H), 5.02 (d, J = 1.5 Hz, 1H, 1 β -H), 4.30 (dd, J = 4.2, 1.4 Hz, 1H, 2 β -H), 4.55 (dd, J = 4.6, 1.5 Hz, 1H, 2 α -H), 4.17 – 4.07 (dd, J = 9.7, 4.7 Hz, 1H, 3 α -H), 3.82 – 3.81 (m, 5H, 6 α -, 5-, 6 β -H), 3.68 (m, 1H, 3 β -H), 3.61 (d, J = 7.4 Hz, 1H, 4 α -H), 3.48 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 4 β -H), 3.34 – 3.33 (m, 2H, 8 α -H), 3.28 – 3.24 (m, 1H, 5 β -H) ppm.

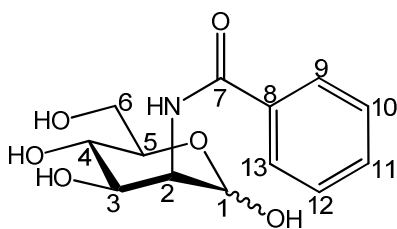
^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 176.15 (C-7 β), 175.11 (C-7 α), 137.44 (C-9), 130.81 (C-10 β , -14 β), 130.61 (C-10 α , -14 α), 129.98 (C-11, -13), 128.20 (C-12 α), 95.40 (C-1 β), 95.25 (C-1 α), 78.72 (C-5 β), 74.97 (C-3 β), 73.89 (C-5 α), 70.98 (C-3 α), 69.03 (C-4 α), 68.69 (C-4 β), 62.77 (C-6 α), 62.62 (C-6 β), 56.44 (C-2 β), 55.72 (C-2 α), 48.33 (C-8) ppm.

***N*-Benzoyl-D-mannosamin (ManNBz) (149)**

Nach langsame Zugabe von 1.363 g (6.024 mmol, 1 Äq.) Benzoylsäureanhydrid in die Lösung von 1.0 g (4.634 mmol, 1 Äq.) ManNH₂·HCl in 25 mL MeOH/NaOH(3N) (v/v, 10:1) bei 0 °C wird diese Mischung weiter bei 0 °C für 1 h und dann bei RT über Nacht gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung wird der pH-Wert der Mischung mit 2 N HCl auf pH 7 eingestellt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand über Kieselgel mit C/M (5:1) chromatographiert. Die gesammelten Produkt-Fractionen werden im Vakuum eingengt, mit EE (6 x 30 mL) gewaschen und im HV getrocknet.

Ausbeute: 1.06 g (81%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.21 (C/M, 5:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.08 – 7.99 (m, 2H, 9 β -, 13 β -H), 7.87 – 7.83 (m, 2H, 9 α -, 13 α -H), 7.60 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 11 β -H), 7.55 (t, J = 7.4 Hz, 1H, 11 α -H), 7.48 (t, J = 7.8 Hz, 4H, 10 α -, 10 β -, 12 α -, 12 β -H), 5.19 (s, 1H, 1 α -H), 5.02 (d, J = 1.4 Hz, 1H, 1 β -H), 4.67 (d, J = 4.2 Hz, 1H, 2 β -H), 4.55 (d, J = 5.9 Hz, 1H, 2 α -H), 4.17 – 4.07 (m, 1H, 3 α -H), 3.92 (dd, J = 11.5, 3.5 Hz, 1H, 6 α -H), 3.83 – 3.88 (m, 3H, 6 β -, 5 α -H), 3.81 – 3.70 (m, 3H, 6 α -, 3 β -, 4 α -H), 3.64 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 4 β -H), 3.36 – 3.26 (m, 1H, 5 β -H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 172.13 (C-7 β), 171.24 (C-7 α), 135.64 (C-8 α), 132.31 (C-11 β), 130.37 (C-11 α), 129.16 (C-10 α , -12 α), 128.34 (C-9 β , -13 β), 94.82 (C-1 β), 94.61 (C-

1 α), 77.96 (C-5 β), 74.58 (C-3 β), 73.08 (C-5 α), 70.59 (C-3 α), 67.98 (C-4 α), 67.70 (C-4 β), 61.61 (C-6 α), 61.49 (C-6 β), 56.29 (C-2 β), 55.55 (C-2 α) ppm.

***N*-Methylsulfonyl-D-mannosamin (ManNMs) (150)**

Ansatz nach AAV 6c

ManNH₂·HCl: 300 mg (1.389 mmol, 1 Äq.)

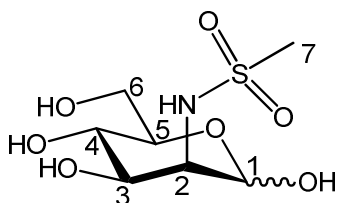
Mesylchlorid: 108 μ L (1,389 mmol, 1 Äq.)

Et₃N: 192 μ L (1.389 mmol, 1 Äq.)

DMF*: 10 mL

Ausbeute: 0.25 g (70%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 5:1)

R_f = 0.46 (C/M, 2:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.24 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 1 α -H), 5.01 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 1 β -H), 4.02 (dd, J = 9.8, 4.6 Hz, 1H, 3 α -H), 3.87 (dd, J = 7.3, 1.9 Hz, 1H, 2 β -H), 3.86 – 3.71 (m, 8H, 6 α -, 6 β -, 5 α -, 3 β -, 2 α -H), 3.53 (t, J = 9.7 Hz, 1H, 4 α -H), 3.45 (t, J = 9.7 Hz, 1H, 4 β -H), 3.39 (ddd, J = 9.9, 5.4, 2.2 Hz, 1H, 5 β -H), 3.17 (s, 3H, 7 β -H), 3.14 (s, 3H, 7 α -H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 93.97 (C-1 α), 92.82 (C-1 β), 76.50 (C-5 β), 72.24 (C-5 α), 71.67 (C-3 β), 68.44 (C-3 α), 66.88 (C-4 α), 66.69 (C-4 β), 60.68 (C-6 β -, 6 α), 58.78 (C-2 β), 57.32 (C-2 α), 41.60 (C-7 β), 40.84 (C-7 α) ppm.

N-Azidopentanoyl-D-mannosamin (ManNpN₃) (151)

Ansatz I nach AAV 6b

ManNH₂·HCl: 1.1 g (5.087 mmol, 1 Äq.)

Azido-säure (23): 1.2 g (6.105 mmol, 1.2 Äq.)

Et₃N: 1.0 mL

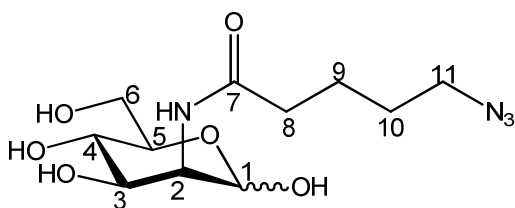
HOBt: 0.756 g (5.596 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 0.945 mL (6.104 mmol, 1.2 Äq.)

DMF*: 50 mL

Ausbeute: 0.805 g (52%), als farbloser Schaum nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M, 6:1)

R_f = 0.51 (C/M, 4:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.02 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 1α-H), 4.90 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 1β-H), 4.41 (dd, *J* = 4.4, 1.5 Hz, 1H, 2β-H), 4.30 (dd, *J* = 4.7, 1.5 Hz, 1H, 2α-H), 4.02 (dd, *J* = 9.6, 4.7 Hz, 1H, 3α-H), 3.86 – 3.85 (m, 3H, 6α-, 6β-H), 3.80 – 3.78 (m, 2H, 6α-, 5α-H), 3.68 (dd, *J* = 9.7, 4.4 Hz, 1H, 3β-H), 3.62 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, 4α-H), 3.50 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, 4β-H), 3.36 – 3.32 (m, 4H, 11α-, 11β-H), 3.23 – 3.22 (m, 1H, 5β-H), 2.34 – 2.32 (m, 4H, 8β-, 8α-H), 1.71 (m, 4H, 9α-, 9β-H), 1.66 – 1.65 (m, 4H, 10α-, 10β-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 180.0 (C-7β), 178.79 (C-7α), 97.38 (C-1α, -1β), 80.0 (C-5β), 77.5 (C-3β), 75.90 (C-5α), 73.04 (C-3α), 70.97 (C-4α), 70.9 (C-4β), 64.70 (C-6α, -6β), 59.0 (C-2β), 57.46 (C-2α), 54.60 (C-11α), 38.65 (C-8α), 31.81 (C-10), 26.50 (C-9) ppm.

N-Azidohexanoyl-D-mannosamin (ManNhN₃) (152)

Ansatz I nach AAV 6b

ManNH₂·HCl: 2 g (9.276 mmol, 1 Äq.)

Azido-säure (**24**): 2.08 g (12.06 mmol, 1.3 Äq.)

Et₃N: 1.8 mL

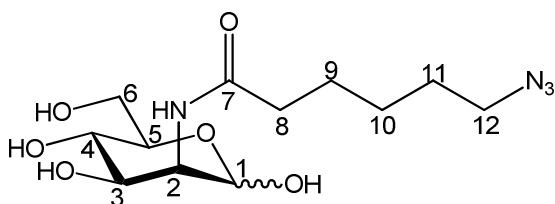
HOBt: 1.379 g (10.20 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 1.723 mL (11.12 mmol, 1.2 Äq.)

DMF*: 60 mL

Ausbeute: 2.384 g (81%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit C/M (5:1)

R_f = 0.31 (C/M, 4:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.90 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, 1 α -H), 4.78 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 1 β -H), 4.29 (dd, *J* = 4.4, 1.5 Hz, 1H, 2 β -H), 4.18 (dd, *J* = 4.7, 1.5 Hz, 1H, 2 α -H), 3.90 (dd, *J* = 9.6, 4.7 Hz, 1H, 3 α -H), 3.73 (m, 3H, 6 $\alpha\alpha$ -, 6 β -H), 3.68 – 3.66 (m, 2H, 6 $\alpha\beta$ -, 5 α -H), 3.54 (dd, *J* = 9.7, 4.4 Hz, 1H, 3 β -H), 3.49 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, 4 α -H), 3.35 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, 4 β -H), 3.22 – 3.21 (m, 4H, 12 α -, 12 β -H), 3.20 – 3.28 (m, 1H, 5 β -H), 2.19 – 2.18 (m, 4H, 8 α -, 8 β -H), 1.57 – 1.50 (m, 8H, 9 α -, 9 β -, 11 α -, 11 β -H), 1.34 – 1.33 (m, 4H, 10 α -, 10 β -H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 178.38 (C-7 β), 177.16 (C-7 α), 95.41 (C-1 α -, -1 β), 78.67 (C-5 β), 74.99 (C-3 β), 73.85 (C-5 α), 71.03 (C-3 α), 68.92 (C-4 α), 68.55 (C-4 β), 62.68 (C-6 α), 62.50 (C-6 β), 55.20 (C-2 β), 55.46 (C-2 α), 52.72 (C-16 α -, -16 β), 37.28 (C-8 β), 37.13 (C-8 α), 27.79 (C-11), 26.85 (C-10), 26.81 (C-9) ppm.

N-Azidodocanoyl-D-mannosamin (ManNdcN₃) (153)

Ansatz I nach AAV 6b

ManNH₂·HCl: 1 g (4.638 mmol, 1 Äq.)

Azido-säure (25): 1.19 g (5.566 mmol, 1.2 Äq.)

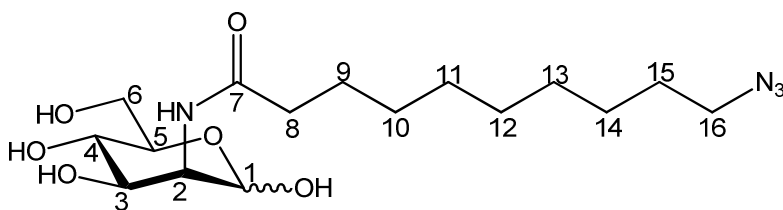
Et₃N: 1.0 mL

HOBt: 0.689 g (5.10 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 0.861 mL (5.56 mmol, 1.2 Äq.)

DMF*: 40 mL

Ausbeute: 1.32 g (76%), als bräunlicher Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit C/M (8:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 6.45 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 1α-H), 6.36 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 1β-H), 5.83 (dd, *J* = 4.4, 1.5 Hz, 1H, 2β-H), 5.71 (dd, *J* = 4.7, 1.5 Hz, 1H, 2α-H), 5.44 (dd, *J* = 9.7, 4.7 Hz, 1H, 3α-H), 5.28 – 5.20 (m, 5H, 6α-, 5α-, 6β-H), 5.16 (dd, *J* = 9.7, 4.4 Hz, 1H, 3β-H), 5.03 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, 4α-H), 4.92 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, 4β-H), 4.73 (dt, *J* = 3.3, 1.6 Hz, 1H, 5β-H), 4.70 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, 16α-H), 3.75 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H, 8β-H), 3.70 (dd, *J* = 6.9, 7.8 Hz, 2H, 8α-H), 3.08 – 2.93 (m, 8H, 9-, 15-H), 2.83 – 2.69 (m, 16H, 11-, 12-, 13-, 14-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 179.05 (C-7β), 178.02 (C-7α), 94.87 (C-1α), 94.71 (C-1β), 78.02 (C-5β), 74.05 (C-3β), 73.50 (C-5α), 70.46 (C-3α), 68.34 (C-4α), 68.04 (C-4β), 62.05 (C-6α), 61.94 (C-6β), 55.62 (C-2β), 54.81 (C-2α), 52.55 (C-16α, -16β), 37.26 (C-8β), 37.06 (C-8α), 30.31 (C-15), 30.26 (C-14), 30.22 (C-12), 30.15 (C-11), 30.05 (C-13), 29.74 (C-10), 27.69 (C-15), 26.93 (C-9) ppm.

***N*-(5-(9-Oxo-9*H*-acridin-10-yl)-pentanoyl-D-mannosamin (ManNpAcr) (154)**

Ansatz nach AAV 6b

ManNH₂·HCl: 132 mg (0.618 mmol, 1 Äq.)

Acr-P-COOH (**32**): 183 mg (0.618 mmol, 1 Äq.)

Et₃N: 85 µL

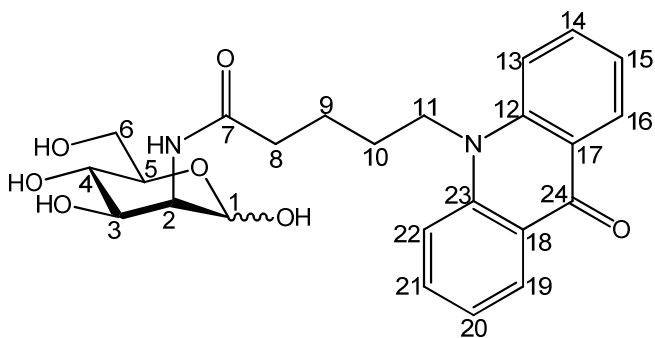
HOBt: 92 mg (0.680 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 115 µL (0.742 mmol, 1.2 Äq.)

DMF*: 15 mL

Ausbeute: 147 mg (52%), als hellgelber Schaum nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit C/M (10:1)

R_f = 0.26 (C/M, 4:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.30 (dd, 2H, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 13-, 22-H), 7.74 – 7.68 (m, 5H, NH, 20-, 15-H), 7.19 (td, 2H, = 7.8, 0.6 Hz, 21-, 14-H), 4.90 (d, 1 H, *J* = 1.3 Hz, 1α-H), 4.35 - 4.34 (m, 2H, 11-H), 4.22 (dd, 1H, *J* = 1.5, 4.7 Hz, 2α-H), 3.92 (dd, 1 H, *J* = 4.7, 9.6 Hz, 3α-H), 3.73 – 3.67 (m, 3H, 6αa-, 5α-, 6αb-H), 3.51 (t, 1 H, *J* = 9.7 Hz, 4α-H), 2.38 - 2.30 (m, 2H, 8-H), 1.82 - 1.79 (m, 4H, 9-, 10-H) ppm.

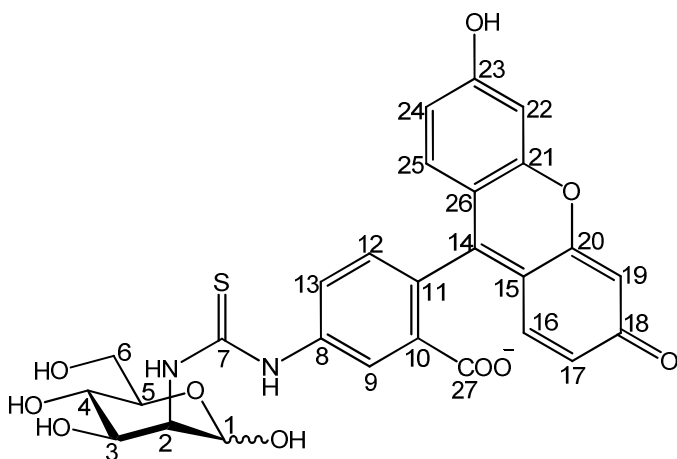
¹³C NMR (126 MHz): δ = 180.17 (C-24), 176.68 (C-7), 143.53 (C-22, -23), 136.18 (C-20, -15), 128.58 (C-13, -22), 132.05 (C-14, -21), 117.13 (C-16, -19), 111.98 (C-17, -18), 95.44 (C-1α), 73.87 (C-5α), 70.99 (C-3α), 68.97 (C-4α), 62.69 (C-6α), 55.50 (C-2α), 47.28 (C-11), 36.63 (C-8), 28.09 (C-9), 24.21 (C-10) ppm.

N-(*N*-Fluoresceinyl- thioureido)-D-mannoamin (ManNFITC) (155)

Eine Mischung aus 30 mg (0.139 mmol, 1.5 Äq.) $\text{ManNH}_2 \cdot \text{HCl}$, 38.8 μL (0.279 mmol, 3 Äq.) Et_3N und 36.2 mg (0.093 mmol, 1 Äq.) FITC in 2 mL DMSO* wird bei RT gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch mit C/M (2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 36 mg (68%), als gelber Feststoff

$R_f = 0.27$ (C/M/W, 20:10:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 8.04$ (s, 1H, 10-H), 7.78 (dd, $J = 1.7, 8.1$ Hz, 1H, 12-H), 7.15 (dd, $J = 1.4, 8.2$ Hz, 1H, 13-H), 6.81 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 16-, 25-H), 6.65 (s, 2H, 19-, 22-H), 6.55 (d, 1H, $J = 1.2, 8.9$ Hz, 17-, 24-H), 5.76 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, 1-H), 3.83 – 3.80 (m, 2H, 2-, 3-H), 3.75 (dd, $J = 2.8$ Hz, 1H, 6a-H), 3.68 (m, 1H, 5-H), 3.63 – 3.57 (m, 3H, 6b-, 4-H, NH) ppm.

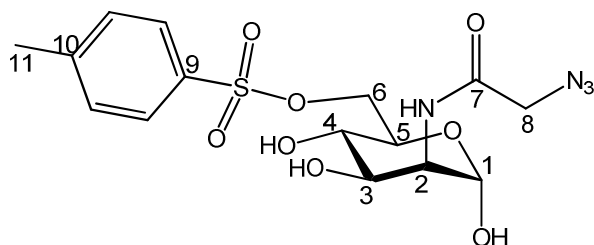
^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 182.90$ (C-18), 173.10 (C-7), 142.41 (C-11), 135.62 (C-14), 134.93 (C-12), 132.46 (C-9), 131.82 (C-13), 131.38 (C-10), 128.18 (C-25), 127.18 (C-13), 114.14 (C-26), 104.99 (C-24), 94.49 (C-19), 90.83 (C-1), 73.50 (C-3), 72.85 (C-4), 71.70 (C-2), 66.99 (C-5), 65.73 (C-6) ppm.

***N*-Azidoacetyl-6-toluolsulfonyl-D-mannosamin (ManNAcN₃-6Tos) (156)**

In eine Lösung von 100 mg (0.381 mmol, 1 Äq.) ManNAcN₃ (146) in 4 mL Pyridin* wird eine Lösung von 198 mg (1.036 mmol, 2.7 Äq.) TosCl in 2 mL Pyridin* bei 0 °C unter Argon als Schutzgas tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird bei 0 °C für 8 h gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über Flash-Kieselgel mit C/M (5:1) chromatographiert.

Ausbeute: 126 mg (79%), als bräunlicher Feststoff

$R_f = 0.48$ (C/M, 5:1)



¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.82 (dd, J = 3.3, 8.2 Hz, 2H, H_{ar}), 7.54 (dd, J = 4.5, 8.1 Hz, 2H, H_{ar}), 5.01 (d, J = 1.3 Hz, 1H, 1 α -H), 4.35 (dd, 1H, 6 α -H), 4.27 – 4.23 (m, 2H, 2 α -, 6 α b-H), 4.04 – 3.94 (m, 4H, 3 α -, 5 α -, 8-H), 3.49 (t, J = 9.7 Hz, 1H, 4 α -H) ppm.

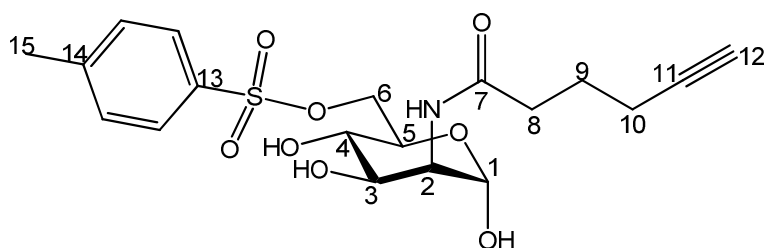
¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 171.24 (C-7), 147.03 (C-9), 134.58 (C-10), 131.49 (C_{ar}), 129.53 (C_{ar}), 94.94 (C-1 α), 71.66 (C-5 α), 71.52 (C-6 α), 70.55 (C-3 α), 68.92 (C-4 α), 55.61 (C-2 α), 53.13 (C-8), 22.07 (C-11) ppm.

***N*-Hex-5-ynoyl- 6-toluolsulfonyl-D-mannosamin (ManNHex-6Tos) (157)**

In eine Lösung von 619 mg (2.265 mmol, 1 Äq.) ManNHex (147) in 20 mL Pyridin* wird eine Lösung von 1.216 g (7.928 mmol, 3.5 Äq.) TosCl in 12 mL Pyridin* bei 0 °C unter Argon als Schutzgas tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird bei 0 °C gerührt, bis eine vollständige Umsetzung beobachtet wird. Die Reaktionsmischung wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand über Flash-Kieselgel mit C/M (8:1) chromatographiert.

Ausbeute: 479 mg (49%), als hellbrauner Feststoff

$R_f = 0.30$ (C/M, 6:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 7.82$ (dd, $J = 3.1, 8.3$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.45 (dd, $J = 4.5, 8.3$ Hz, 2H, H_{ar}), 4.98 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, $1\alpha\text{-H}$), 4.32 (m, 1H, 6a-H), $4.25 - 4.23$ (m, 2H, $2\text{-}, 6\text{b-H}$), $4.01 - 3.95$ (m, 4H, $3\text{-}, 5\text{-H}$), 3.50 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, 4-H), 2.47 (s, 3H, 15-H), 2.40 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, 8-H), $2.27 - 2.28$ (m, 3H, $12\text{-}, 10\text{-H}$), $1.83 - 1.80$ (m, 2H, 9-H) ppm.

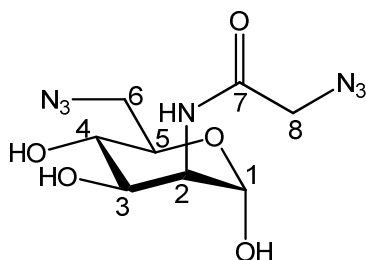
^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): $\delta = 176.64$ (C-7), 146.96 (C-13), 134.64 (C-14), 131.45 (C_{ar}), 129.52 (C_{ar}), 95.11 (C-1), 84.78 (C-11), 71.69 (C-5), 71.67 (C-6), 70.66 (C-3), 70.59 (C-12), 68.92 (C-4), 55.49 (C-2), 36.07 (C-8), 26.37 (C-9), 22.00 (C-15), 19.03 (C-10) ppm.

***N*-Azidoacetyl-6-azido-D-Mannosamin (ManNAcN₃-6N₃) (158)**

Eine Mischung aus 63 mg (0.303 mmol, 1 Äq.) ManNAcN₃-6Tos (**156**) in 10 mL DMF* und 44.5 mg (0.908 mmol, 3 Äq.) 20% N₃Li in H₂O wird auf 65 °C erhitzt und bei dieser Temperatur über Nacht gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand durch Säulenchromatographie mit C/M (10:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 44 mg (51%), als hellbrauner Feststoff.

$R_f = 0.44$ (C/M, 8:1)



^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 4.97 (d, J = 1.4 Hz, 1H, 1 α -H), 4.16 (dd, J = 4.6, 1.4 Hz, 1H, 2-H), 3.91 – 3.90 (m, 2H, 3-, 8a-H), 3.86 – 3.82 (m, 2H, 5-, 8b-H), 3.46 – 3.38 (m, 3H, 6a-, 4-, 6b-H) ppm.

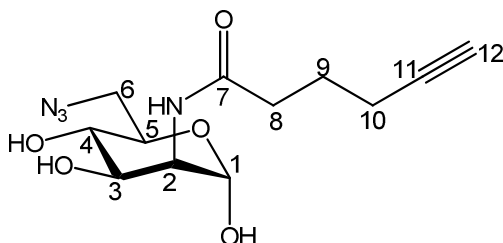
^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 171.19 (C-7), 94.89 (C-1), 72.93 (C-5), 70.39 (C-3), 70.16 (C-4), 55.83 (C-2), 53.25 (C-8), 53.11 (C-6) ppm.

***N*-Hex-5-ynoyl- 6-azido-D-mannosamin (ManNhex-6-N₃) (159)**

Eine Mischung aus 67 mg (0.167 mmol, 1 Äq.) ManNHex-6Tos (**157**) in 8 mL DMF*, 122 mg (1.881 mmol, 12 Äq.) NaN₃ und 5 mg ^tBuNI wird auf 65 °C erhitzt und bei dieser Temperatur über Nacht gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand durch Säulenchromatographie mit C/M (10:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 15 mg (31%), als hellbrauner Feststoff.

R_f = 0.40 (C/M, 5:1)



^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 176.22 (C-7), 92.99 (C-1), 84.76 (C-11), 73.69 (C-5), 72.83 (C-3), 72.56 (C-4), 70.47 (C-12), 56.17 (C-2), 53.31 (C-6), 36.27 (C-8), 26.42 (C-9), 19.06 (C-10) ppm.

ESI-MS: C₁₂H₁₈N₄NaO₅ [M + Na]⁺: berechnet 321.12, gemessen 321.2

9-Azido-3-desoxy- D-*glycero*-D-*galacto*-non-2-ulopyranosonsäure (KDN-9N₃) (161)

Ansatz nach AAV 9

Man-6-N₃ (132): 700 mg (3.41 mmol, 2 Äq.)

Na-Pyruvat: 188 mg (1.71 mmol, 1 Äq.)

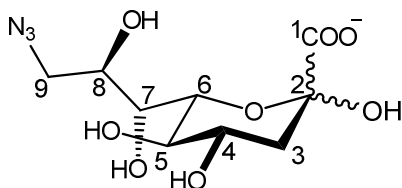
Aldolase: 5 mg

NaN₃ (1 M): 160 μ L

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 12 mL

Ausbeute: 415 mg (83% bezogen auf Na-Pyruvat), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.39$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 3.96 – 3.84 (m, 3H, 4-, 5-, 6-H), 3.81 (dt, J = 9.2, 4.7 Hz, 1H, 8-H), 3.58 (dd, J = 13.1, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.55 – 3.50 (m, 1H, 7-H), 3.45 (dd, J = 13.1, 6.2 Hz, 1H, 9b-H), 2.12 (dd, J = 13.0, 5.1 Hz, 1H, 3a-H), 1.73 (dd, J = 13.0, 11.8 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 177.21 (C-1), 96.84 (C-2), 71.73 (C-5), 70.79 (C-7), 69.82 (C-4), 69.53 (C-6), 69.09 (C-8), 61.64 (C-9), 39.55 (C-3) ppm.

9-Azido-*N*-acetyl-D-neuraminsäure (Neu5Ac-9N₃) (162)

Ansatz nach AAV 9

ManNAc-6N₃ (135): 400 mg (1.625 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 447 mg (4.06 mmol, 2.5 Äq.)

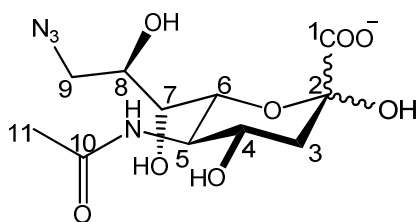
Aldolase: 6 mg

NaN₃ (1 M): 160 μ L

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 10 mL

Ausbeute: 457 mg (79%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.43$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



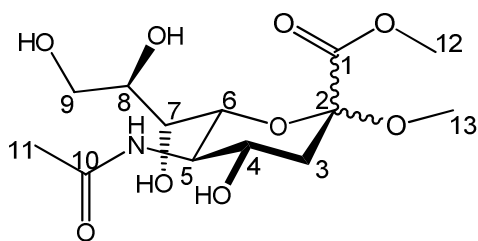
¹H NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 4.03 - 3.90$ (m, 2H, 4-, 6-H), $3.89 - 3.81$ (m, 2H, 5-, 8-H), 3.56 (dd, $J = 13.1, 2.5$ Hz, 1H, 9a-H), 3.47 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, 7-H), 3.42 (dd, $J = 13.1, 6.1$ Hz, 1H, 9b-H), 2.16 (dd, $J = 13.0, 4.9$ Hz, 1H, 3a-H), 2.01 (s, 3H, 11-H), 1.78 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H, 3b-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): $\delta = 176.25$ (C-1), 174.35 (C-10), 96.00 (C-2), 69.65 (C-6), 68.70 (C-5), 68.59 (C-7), 66.88 (C-4), 53.51 (C-9), 51.90 (C-8), 39.00 (C-3), 21.72 (C-11) ppm.

2-O-Methoxy-N-acetyl-D-neuraminosäuremethylester (164)

Eine Mischung aus 4.0 g (12.98 mmol) Neu5Ac und 8.889 g H⁺-Ionenaustauscher in 750 mL MeOH* wird unter Rückfluss über Nacht gerührt, bis die DC-Kontrolle eine vollständige Umsetzung zeigt. Die Mischung wird warm filtriert und im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wird in 10 mL MeOH gelöst und mit 30 mL Et₂O versetzt. Die entstandenen farblosen Kristalle werden mit kaltem Et₂O zweimal gewaschen und an der HV-Pumpe getrocknet. Man erhält 2.24 g (51%) Produkt als farblose Kristalle.

$R_f = 0.36$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 40:40:5:15)



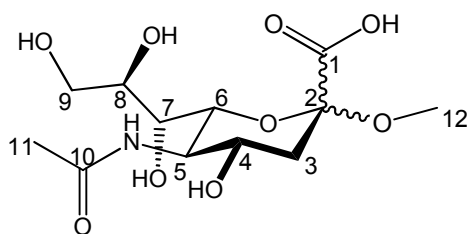
^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 4.01 – 3.98 (m, 1H, 4-H), 3.86 – 3.77 (m, 6H, 5-, 12-, 6-, 8-, 9a-H), 3.61 (dd, J = 12.1, 5.8 Hz, 1H, 9b-H), 3.52 (d, J = 9.8 Hz, 1H, 7-H), 3.21 (s, 2H, 13-H), 2.33 (dd, J = 13.2, 4.9 Hz, 1H, 3a-H), 1.98 (s, 3H, 11-H), 1.73 (dd, J = 11.4, 1.7 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 175.21 (C-10), 170.79 (C-1), 99.60 (C-2), 70.94 (C-6), 70.24 (C-8), 68.43 (C-7), 66.80 (C-4), 63.77 (C-9), 53.94 (C-12), 52.10 (C-5), 51.40 (C-13), 39.59 (C-3), 22.48 (C-11) ppm.

2-*O*-Methoxy-5-acetyl-D-neuraminsäure (165)

Eine Lösung von 2.24 g (6.64 mmol) Neu5Ac-Derivat (**164**) in 170 mL NaOH-Lösung (0.06 M) wird bei RT für 3 h gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung wird H^+ -Ionenaustauscher der Mischung zugegeben bis der pH-Wert 7.0 ist. Die Reaktionsmischung wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 1.97 g (92%) Produkt als gelben Feststoff.

R_f = 0.19 (n-BuOH/Aceton/AcOH/ H_2O , 35:35:7:23)



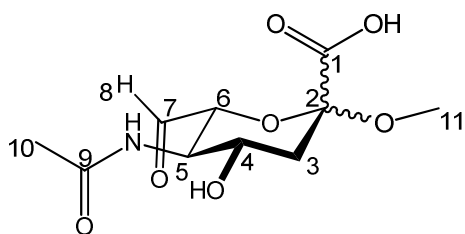
^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ = 4.02 – 3.89 (m, 1H, 4-H), 3.88 – 3.68 (m, 4H, 6-, 9a-, 5-, 8-H), 3.60 (dd, J = 12.1, 5.9 Hz, 1H, 9b-H), 3.47 (d, J = 9.4 Hz, 1H, 7-H), 3.14 (s, 3H, 12-H), 2.28 (dd, J = 13.2, 4.8 Hz, 1H, 3a-H), 1.99 (s, 3H, 11-H), 1.59 (dd, J = 12.6, 11.8 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ = 175.34 (C-10), 174.74 (C-1), 100.44 (C-2), 70.13 (C-6), 70.02 (C-8), 68.43 (C-7), 67.08 (C-4), 63.54 (C-9), 52.00 (C-12), 50.47 (C-5), 39.79 (C-3), 22.13 (C-11) ppm.

(4S,5R,6R)-5-Acetamido-6-formyl-4-hydroxy-2-methoxytetrahydro-2H-pyran-2-carboxylsäure (166)

In einer Lösung von 1.92 g (5.94 mmol, 1 Äq.) **165** in 65 mL H₂O werden 154 mL (30.89 mmol, 5.2 Äq.) NaIO₄-Lösung (0.2 M) bei RT zugegeben und gerührt. Nach 2-stündigem Rühren wird eine vollständige Umsetzung auf dem DC beobachtet. Um das restliche NaIO₄ und das entstandene NaI zu entfernen, werden 226 mL BaAc₂ (0.1 M) der Mischung zugesetzt. Das Ba-Salz wird dann mit eingeleitetem CO₂ ausgefällt und abfiltriert. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält einen gelben Feststoff, das ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt wird.

$R_f = 0.34$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.40 (s, 1H, 8-H), 3.92 (ddd, $J = 11.4, 10.1, 5.0$ Hz, 1H, 4-H), 3.71 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H, 5-H), 3.49 (dd, $J = 10.5, 1.7$ Hz, 1H, 6-H), 3.14 (s, 3H, 11-H), 2.31 (dd, $J = 13.2, 5.0$ Hz, 1H, 3a-H), 1.98 (s, 3H, 10-H), 1.61 (dd, $J = 13.2, 11.5$ Hz, 1H, 3b-H) ppm.

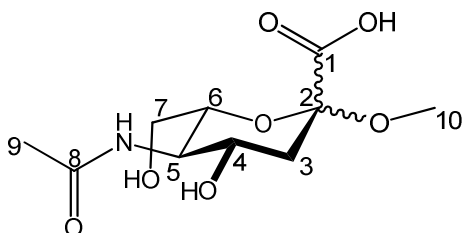
¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.28 (C-9), 174.91 (C-1), 171.48 (C-7), 100.78 (C-2), 73.97 (C-6), 67.28 (C-4), 53.05 (C-5), 50.92 (C-10), 40.03 (C-3), 22.59 (C-10) ppm.

2-*O*-Methoxy-*N*-acetyl-5-amino-3,5-dideoxy- α -L-*arabino*-2-heptulopyranosonsäure (167)

Eine Mischung aus Substrat **166** und 360 mL NaBH₄-Lösung (40 mM in 10 mM NaOH) wird bei RT für 1 h gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung wird überschüssiges NaBH₄ mittels H⁺-Ionenaustauscher zersetzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über Kieselgel mit EE/MeOH/AcOH (80:20:1) chromatographiert.

Ausbeute: 1.33 g (85% bezogen auf Substrat **166**), als farbloser Feststoff.

$R_f = 0.27$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



¹H NMR (300 MHz, D₂O): $\delta = 3.93$ (ddd, $J = 11.4, 9.9, 5.0$ Hz, 1H, 4-H), 3.72 – 3.55 (m, 3H, 7-, 5-H), 3.48 (ddd, $J = 10.5, 5.2, 2.6$ Hz, 1H, 6-H), 3.11 (s, 3H, 10-H), 2.31 (dd, $J = 13.2, 5.1$ Hz, 1H, 3a-H), 1.98 (s, 3H, 9-H), 1.58 (dd, $J = 13.2, 11.4$ Hz, 1H, 3b-H) ppm.

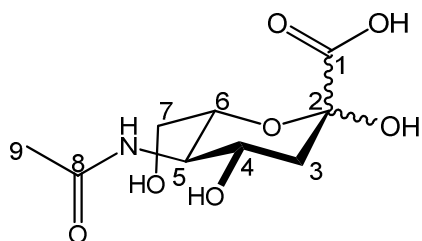
¹³C NMR (75 MHz, D₂O): $\delta = 174.78$ (C-8), 171.10 (C-1), 100.07 (C-2), 72.58 (C-6), 66.74 (C-4), 61.11 (C-7), 52.25 (C-5), 50.35 (C-10), 39.73 (C-3), 22.10 (C-9) ppm.

N-acetyl-5-amino-3,5-dideoxy- α -L-*arabino*-2-heptulopyranosonic acid (168)

1.2 g (4.56 mmol) Substrat **167** werden in 25 mL Ameisensäure (2.5 mM) gelöst, auf 85 °C erhitzt und für 1 h gerührt. Anschließend wird 20 mM Ameisensäure in die Reaktionsmischung tropfenweise zugegeben, bis der pH-Wert auf 4 eingestellt. Nach der vollständigen Umsetzung wird die Mischung filtriert und im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wird mehrmals mit H₂O ko-evaporiert, um die übrige Ameisensäure zu entfernen.

Ausbeute: 0.95 g (84%), als bräunlicher Feststoff.

$R_f = 0.26$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 3.97 (ddd, J = 11.5, 10.4, 4.9 Hz, 1H, 4-H), 3.80 (ddd, J = 10.6, 5.0, 2.5 Hz, 1H, 6-H), 3.67 (t, J = 10.3 Hz, 1H, 5-H), 3.64 – 3.54 (m, 2H, 7-H), 2.27 (dd, J = 13.1, 5.0 Hz, 1H, 3a-H), 1.98 (s, 3H, 9-H), 1.81 (dd, J = 12.8, 11.9 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 174.79 (C-8), 173.05 (C-1), 94.94 (C-2), 72.90 (C-6), 66.34 (C-4), 60.74 (C-7), 52.26 (C-5), 38.74 (C-3), 22.05 (C-9) ppm.

3-Desoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-non-2-ulopyranosonsäure (KDN) (169)

Ansatz nach AAV 9

Mannose: 2.0 g (11.1 mmol, 3 Äq.)

Na-Pyruvat: 0.407 g (3.7 mmol, 1 Äq.)

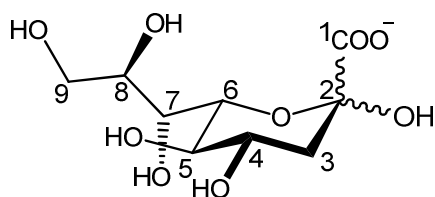
Aldolase: 25 mg

NaN_3 (1 M): 420 μL

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 50 mL

Ausbeute: 0.74 g (75% bezogen auf Na-Pyruvat), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

R_f = 0.17 (n-BuOH/Aceton/AcOH/ H_2O , 35:35:7:23)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 3.98 – 3.90 (m, 1H, 4-H), 3.89 (dd, J = 9.9, 1.2 Hz, 1H, 6-H), 3.84 – 3.77 (m, 2H, 9a-, 7-H), 3.70 (ddd, J = 9.0, 6.4, 2.7 Hz, 1H, 8-H), 3.60 (dd, J = 11.8, 6.4 Hz, 1H, 9b-H), 3.52 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 5-H), 2.15 (dd, J = 13.0, 5.1 Hz, 1H, 3a-H), 1.74 (dd, J = 13.0, 11.8 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 175.42 (C-1), 95.95 (C-2), 71.57 (C-4), 70.55 (C-8), 70.22 (C-5), 68.91 (C-6), 68.09 (C-7), 63.29 (C-9), 38.89 (C-3) ppm.

N-Glycolyl-D-neuraminsäure (Neu5Gc) (171)

Ansatz nach AAV 9

ManNGc (**145**): 964 mg (4.064 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 1.118 g (10.10 mmol, 2.5 Äq.)

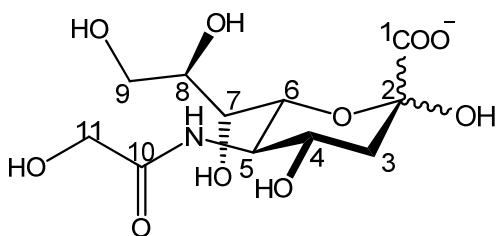
Aldolase: 15 mg

NaN_3 (1 M): 310 μL

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 30 mL

Ausbeute: 1.06 g (75%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

R_f = 0.15 (n-BuOH/Aceton/AcOH/ H_2O , 35:35:7:23)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 3.94 – 3.81 (m, 4H, 4-, 11-, 6-H), 3.73 (t, J = 10.3 Hz, 1H, 5-H), 3.55 (dd, J = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.50 – 3.42 (m, 1H, 8-H), 3.34 (dd, J = 11.9, 6.2 Hz, 1H, 9b-H), 3.27 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 7-H), 2.05 (dd, J = 13.1, 4.9 Hz, 1H, 3a-H), 1.62 (dd, J = 13.1, 11.6 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 176.02 (C-1), 173.66 (C-10), 95.69 (C-2), 70.58 (C-8, C-6), 68.55 (C-7), 66.84 (C-4), 63.52 (C-9), 61.38 (C-11), 52.15 (C-5), 39.26 (C-3) ppm.

***N*-Azidoacetyl-D-neuraminsäure (Neu5AcN₃) (172)**

Ansatz nach AAV 9

ManNAcN₃ (**146**): 192 mg (0.732 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 161 mg (1.464 mmol, 2 Äq.)

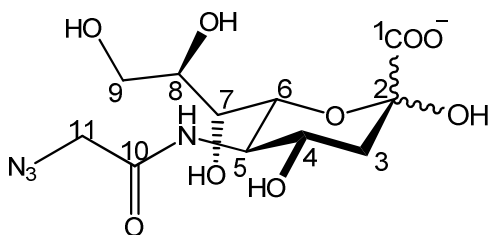
Aldolase: 2 mg

NaN₃ (1 M): 55 μL

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 4 mL

Ausbeute: 212 mg (78%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

R_f = 0.34 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 3.99 – 3.89 (m, 4H, 4-, 6-, 11-H), 3.83 (t, J = 9.7, 1H, 5-H), 3.69 (dd, J = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.61 (ddd, J = 9.2, 6.4, 2.7 Hz, 1H, 8-H), 3.46 (dd, J = 11.9, 6.4 Hz, 1H, 9b-H), 3.36 (d, J = 9.1 Hz, 1H, 7-H), 2.07 (dd, J = 13.0, 4.8 Hz, 1H, 3a-H), 1.69 (dd, J = 12.9, 11.4 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 177.07 (C-1), 171.37 (C-10), 96.80 (C-2), 70.76 (C-8), 70.34 (C-6), 68.91 (C-7), 67.46 (C-4), 63.67 (C-9), 52.79 (C-5), 52.37 (C-11), 39.81 (C-3) ppm.

N-Hex-5-ynoyl-D-neuraminsäure (Neu5Hex) (173)

Ansatz nach AAV 9

ManNHex (147): 1.16 g (4.24 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 1.40 g (12.7 mmol, 3 Äq.)

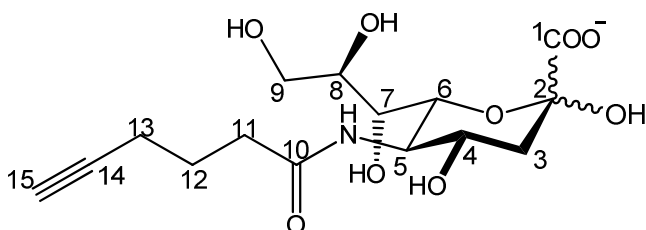
Aldolase: 18 mg

NaN₃ (1 M): 320 µL

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 30 mL

Ausbeute: 1.11 g (73%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.40$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 40:40:5:15)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 3.97 – 3.89 (m, 2H, 4-H, 6-H), 3.84 (t, 1H, J = 9.7 Hz, 5-H), 3.75 (dd, 1H, J = 2.6, 11.9 Hz, 9-Ha), 3.68 (ddd, 1H, J = 9.1, 6.5, 2.7 Hz, 8-H), 3.53 (dd, 1H, J = 11.8, 4.9 Hz, 9-Hb), 3.43 (dd, 1H, J = 1.1, 9.1 Hz, 7-H), 2.36 (td, 2H, J = 2.0, 7.5 Hz, H-11), 2.30 (t, 1H, J = 2.6 Hz, 15-H), 2.21 – 2.15 (m, 2H, 13-H), 2.13 (dd, 1H, J = 4.8, 12.6 Hz, 3-Ha), 1.79 – 1.70 (m, 3H, 12-H, 3-Hb) ppm;

¹³C NMR (126 MHz): δ = 177.1 (C-1, C-10), 96.8 (C-2), 85.1 (C-14), 70.8 (C-8), 70.6 (C-6), 70.4 (C-15), 69.1 (C-7), 67.6 (C-4), 63.7 (C-9), 52.6 (C-5), 39.9 (C-3), 35.1 (C-11), 24.5 (C-12), 17.4 (C-13) ppm.

N-Phenylacetyl-D-neuraminsäure (Neu5PhAc) (174)

Ansatz nach AAV 9

ManNPhAc (**148**): 563 mg (1.987 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 656 mg (5.962 mmol, 3 Äq.)

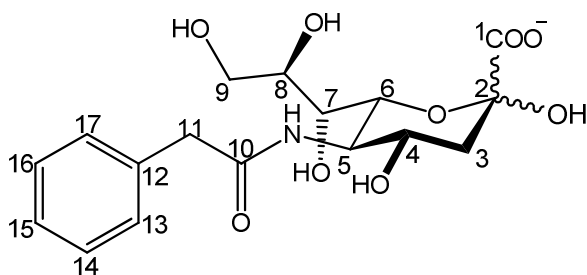
Aldolase: 15 mg

NaN₃ (1 M): 135 µL

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 15 mL

Ausbeute: 508 mg (65%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2 und über Kieselgel mit EE/MEOH/AcOH (80:20:1)

$R_f = 0.46$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.35 (dd, J = 11.5, 3.9 Hz, 2H, 13-, 17-H), 7.31 – 7.25 (m, 3H, 14-, 15-, 16-H), 4.08 – 3.96 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.86 (t, J = 10.3 Hz, 1H, 5-H), 3.68 (dd, J = 11.8, 2.6 Hz, 1H, 9a-H), 3.63 (ddd, J = 9.1, 6.2, 2.6 Hz, 1H, 8-H), 3.58 (d, J = 5.6 Hz, 2H, 11-H), 3.43 (dd, J = 11.8, 6.4 Hz, 1H, 9b-H), 3.30 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 7-H), 2.25 (dd, J = 13.1, 4.9 Hz, 1H, 3a-H), 1.84 – 1.77 (m, 1H, 3b-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.78 (C-1), 173.58 (C-10), 135.42 (C-12), 129.47 (C-15), 129.36 (C-14, -16), 127.73 (C-13, -17), 95.68 (C-2), 70.79 (C-6, -8), 68.62 (C-7), 66.86 (C-4), 63.57 (C-9), 52.51 (C-5), 43.02 (C-11), 39.34 (C-3) ppm.

***N*-Benzoyl-D-neuraminsäure (Neu5Bz) (175)**

Ansatz nach AAV 9

ManNBz (**149**): 150 mg (0.505 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 510 mg (5.045 mmol, 10 Äq.)

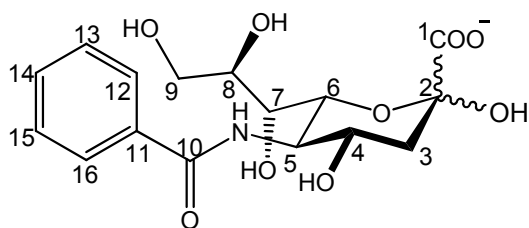
Aldolase: 2 mg

NaN₃ (1 M): 40 µL

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 5 mL

Ausbeute: 165 mg (85%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.63$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.77 – 7.72 (m, 1H, 12-, 16-H), 7.62 – 7.52 (m, 1H, 14-H), 7.52 – 7.43 (m, 2H, 13-, 15-H), 4.19 – 4.07 (m, 3H, 4-, 5-, 6-H), 3.79 (dd, $J = 11.8, 2.8$ Hz, 1H, 9a-H), 3.74 (ddd, $J = 9.2, 6.4, 2.8$ Hz, 1H, 8-H), 3.55 (t, $J = 3.70$, 1H, 9b-H), 3.53 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, 7-H), 2.21 (dd, $J = 12.9, 4.1$ Hz, 1H, 3a-H), 1.89 – 1.81 (m, 1H, 3b-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 177.14 (C-1), 172.13 (C-10), 134.03 (C-11), 132.63 (C-14), 129.16 (C-13, -15), 127.59 (C-12, -16), 96.88 (C-2), 70.81 (C-8), 70.66 (C-4), 69.20 (C-7), 67.62 (C-6), 63.72 (C-9), 53.28 (C-5), 39.98 (C-3) ppm.

***N*-Methanesulfonyl-D-neuraminsäure (Neu5Ms) (176)**

Ansatz nach AAV 9

ManNMs (**150**): 100 mg (0.387 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 128 mg (1.160 mmol, 3 Äq.)

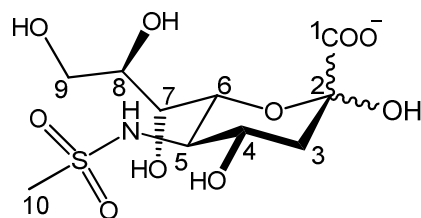
Aldolase: 2 mg

NaN₃ (1 M): 15 µL

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 2 mL

Ausbeute: 85 mg (60%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.27$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 3.89 – 3.82 (m, 2H, 4-H, 6-H), 11-H), 3.76 (d, 1H, J = 9.3 Hz, 7-H), 3.70 (dd, 1H, J = 2.7, 11.9 Hz, 9-Ha), 3.60 (ddd, 1H, J = 2.7, 6.3, 9.3 Hz, 8-H), 3.49 (dd, 1H, J = 6.3, 11.9 Hz, 9-Hb), 3.28 (dd, 1H, J = 10.1, 10.5 Hz, 5-H), 3.03 (s, 3H, CH₃), 2.14 (dd, 1H, J = 13.1, 4.9 Hz, 3-Ha), 1.72 (dd, 1H, J = 13.1, 12.0 Hz, 3-Hb) ppm;

¹³C NMR (126 MHz): δ = 174.5 (C-1), 98.1 (C-2), 73.8 (C-6), 73.1 (C-8), 70.6 (C-7), 70.0 (C-4), 65.9 (C-9), 58.6 (C-5), 44.1 (CH₃), 42.2 (C-3).

***N*-Azidopentanoyl-D-neuraminsäure (Neu5PenN₃) (**177**)**

Ansatz nach AAV 9

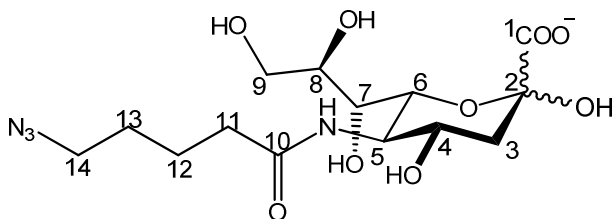
ManNpN₃ (**151**): 427 mg (1.403 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 389 mg (3.508 mmol, 2.5 Äq.)

Aldolase: 4 mg

NaN₃ (1 M): 130 µL

Ausbeute: 349 mg (60%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer
Aufreinigung über Bio-Gel P2

$$R_f = 0.44 \text{ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H}_2\text{O, 35:35:7:23)}$$


¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.02 – 3.92 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.87 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H, 5-H), 3.79 (dd, *J* = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.71 (ddd, *J* = 9.0, 6.4, 2.7 Hz, 1H, 8-H), 3.56 (dd, *J* = 11.8, 6.4 Hz, 1H, 9b-H), 3.45 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, 7-H), 3.31 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, 14-H), 2.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 11-H), 2.17 (dd, *J* = 13.0, 4.8 Hz, 1H, 3a-H), 1.78 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H, 3b-H), 1.64 (m, 2H, 12-H), 1.58 (m, 2H, 13-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 178.46 (C-1), 177.92 (C-10), 97.66 (C-2), 71.58 (C-6), 71.50 (C-8), 69.89 (C-7), 68.41 (C-4), 64.53 (C-9), 53.42 (C-5), 52.00 (C-14), 40.78 (C-3), 36.67 (C-11), 28.78 (C-13), 23.89 (C-12) ppm.

***N*-Azidohexanoyl-D-neuraminsäure (Neu5HexN₃) (178)**

Ansatz nach AAV 9

ManNhN₃ (**152**): 365 mg (1.147 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 254 mg (2.293 mmol, 2 Äq.)

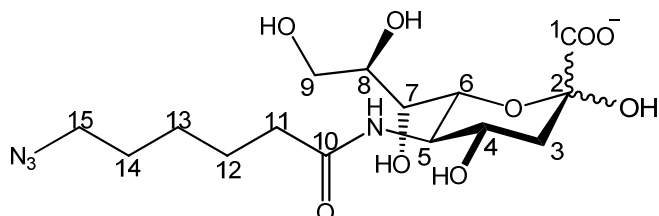
Aldolase: 3.5 mg

NaN₃ (1 M): 120 μL

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 5 mL

Ausbeute: 319 mg (65%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.47$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 3.85 - 3.76$ (m, 2H, 6-, 4-H), 3.69 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H, 5-H), 3.61 (dd, $J = 11.8, 2.7$ Hz, 1H, 9a-H), 3.53 (ddd, $J = 9.1, 6.3, 2.7$ Hz, 1H, 8-H), 3.39 (dd, $J = 11.9, 6.4$ Hz, 1H, 9b-H), 3.29 (dd, $J = 9.1, 1.0$ Hz, 1H, 7-H), 3.11 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, 15-H), 2.10 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 11-H), 2.02 (dd, $J = 13.0, 4.9$ Hz, 1H, 3a-H), 1.62 (dd, $J = 12.9, 11.6$ Hz, 1H, 3b-H), 1.48 – 1.35 (m, 4H, 12-, 14-H), 1.23 – 1.11 (m, 2H, 13-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): $\delta = 178.00$ (C-1), 176.10 (C-10), 96.49 (C-2), 70.73 (C-4), 70.67 (C-8), 69.01 (C-7), 67.38 (C-6), 63.68 (C-9), 52.52 (C-5), 51.40 (C-15), 39.81 (C-3), 36.20 (C-11), 28.09 (C-14), 25.92 (C-13), 25.31 (C-12).

***N*-Azidoacetyl-9-azido-D-neuraminsäure (Neu5AcN₃-9N₃)**

Ansatz nach AAV 9

ManNAcN₃-6N₃ (**158**): 44 mg (0.153 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 51 mg (0.460 mmol, 3 Äq.)

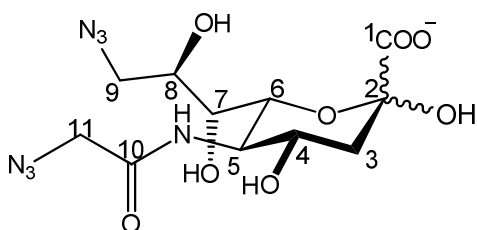
Aldolase: 1.5 mg

NaN₃ (1 M): 18 μ L

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 1.5 mL

Ausbeute: 36 mg (63%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.54$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 40:40:5:15)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 3.94 (s, 2H, 11-H), 3.93 – 3.89 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.83 (t, J = 9.7, 1H, 5-H), 3.76 (ddd, J = 9.2, 6.4, 2.7 Hz, 1H, 8-H), 3.43 (dd, J = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.38 (d, J = 9.1 Hz, 1H, 7-H), 3.32 (dd, J = 11.9, 6.4 Hz, 1H, 9b-H), 2.06 (dd, J = 13.0, 4.8 Hz, 1H, 3a-H), 1.68 (dd, J = 12.9, 11.4 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 177.02 (C-1), 171.35 (C-10), 96.80 (C-2), 70.16 (C-6), 69.53 (C-8), 69.34 (C-7), 67.42 (C-4), 54.28 (C-9), 52.81 (C-5), 52.39 (C-11), 39.82 (C-3) ppm.

***N*-(4-(*N'*-β-D-Glucopyranosyl)-amido)-butanoyl-D-neuraminsäure (181)**

Ansatz nach AAV 9

Glc-L4-ManN (**90**): 37 mg (0.084 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 92 mg (0.840 mmol, 10 Äq.)

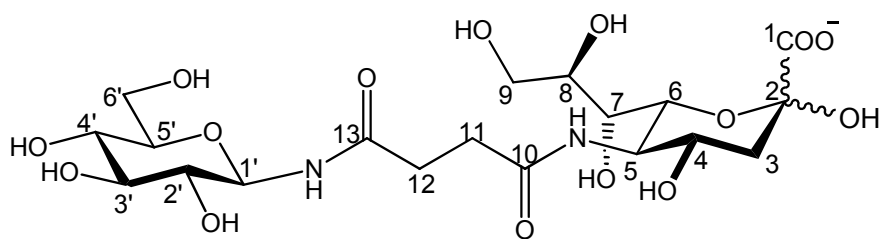
Aldolase: 3 mg

NaN₃ (1 M): 10 μL

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 2 mL

Ausbeute: 26 mg (56%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.31$ (EE/MeOH/H₂O/AcOH, 30:30:20:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 4.66 (d, J = 9.1 Hz, 1H, 1'-H), 3.69 (m, 1H, 4-H), 3.70 (dd, J = 1.0, 10.4 Hz, 1H, 6-H), 3.62 (t, J = 10.1 Hz, 1H, 5-H), 3.57 (dd, J = 12.4, 2.1 Hz, 1H, 9a-H), 3.54 (dd, J = 11.9, 2.7 Hz, 1H, 6'a-H), 3.47 – 3.45 (m, 1H, 5'-H), 3.42 (dd, J = 12.4, 5.4 Hz, 1H, 9b-H), 3.33 (dd, J = 11.9, 6.3 Hz, 1H, 6'b-H), 3.25 – 3.23 (m, 3H, 4'-, 3'-, 8-H), 3.14 – 3.09 (m, 7-, 2'-H), 2.36 – 2.32 (m, 4H, 11-, 12-H), 1.92 (dd, J = 12.4, 4.9 Hz, 1H, 3a-H), 1.53 (dd, J = 12.8, 11.6 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 177.11 (C-1), 176.49 (C-10), 175.80 (C-13), 96.81 (C-2), 79.69 (C-1'), 77.94 (C-8), 76.86 (C-3'), 72.19 (C-2'), 70.82 (C-5'), 70.64 (C-6), 69.66 (C-7), 68.94 (C-4'), 67.64 (C-4), 63.73 (C-6'), 60.97 (C-9), 52.69 (C-5), 39.76 (C-3), 31.18 (C-11), 31.02 (C-14) ppm.

***N*-(4-(*N'*-β-D-Glucopyranosyl)-amido)-hexanoyl-D-neuraminsäure (182)**

Ansatz nach AAV 9

Glc-L6-ManN (**91**): 20 mg (0.043 mmol, 1 Äq.)

Na-Pyruvat: 43 mg (0.43 mmol, 10 Äq.)

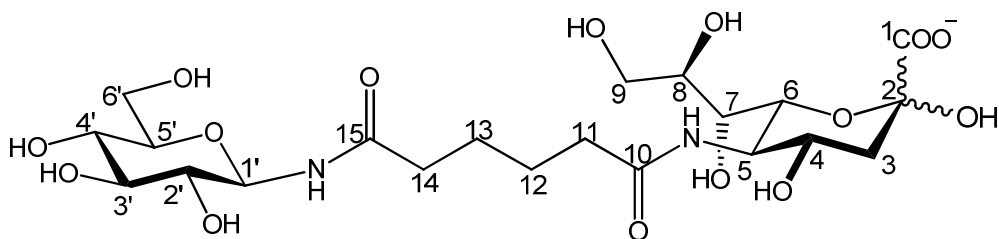
Aldolase: 3 mg

NaN_3 (1 M): 4 μL

Phosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.6): 1.6 mL

Ausbeute: 15 mg (63%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

R_f = 0.42 (EE/MeOH/ H_2O /AcOH, 30:30:20:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 4.63 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 1'-H), 3.71 – 3.67 (m, 1H, 4-H), 3.66 (dd, J = 10.3, 1.2 Hz, 1H, 6-H), 3.60 (t, J = 10.1 Hz, 1H, 5-H), 3.55 (dd, J = 12.3, 2.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.55 (dd, J = 11.9, 2.7 Hz, 1H, 6'a-H), 3.44 – 3.41 (m, 1H, 5'-H), 3.39 (dd, J = 12.4, 5.3 Hz, 1H, 9b-H), 3.28 (dd, J = 11.9, 6.3 Hz, 1H, 6'b-H), 3.22 – 3.18 (m, 2H, 3'-, 8-H), 3.16 (t, J = 9.2 Hz, 1H, 4'-H), 3.10 – 3.05 (m, 2H, 7-, 2'-H), 2.04 – 2.00 (m, 4H, 11-, 14-H), 1.88 (dd, J = 12.9, 4.8 Hz, 1H, 3a-H), 1.49 (dd, J = 12.9, 11.6 Hz, 1H, 3b-H), 1.33 – 1.31 (m, 4H, 12-, 13-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 178.29 (C-1), 177.58 (C-10), 177.12 (C-15), 96.75 (C-2), 79.55 (C-1'), 77.88 (C-3'), 76.82 (C-8), 72.07 (C-2'), 70.62 (C-6), 70.55 (C-5'), 69.55 (C-7), 68.93 (C-4'), 67.51 (C-4), 63.57 (C-6'), 60.86 (C-9), 52.49 (C-5), 39.84 (C-3), 35.95 (C-11), 35.67 (C-14), 25.12 (C-12), 24.82 (C-13) ppm.

***N*-Acetyl-9-amino-D-neuraminsäure (Neu5Ac-9NH₂) (184)**

Ansatz nach AAV 5b

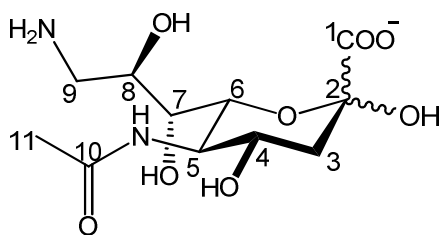
Neu5Ac-9N₃ (**162**): 200 mg (0.561 mmol, 1 Äq.)

PPh₃: 618 mg (2.358 mmol, 4.2 Äq.)

MeOH/H₂O (10:0.5) : 40 mL

Ausbeute: 180 mg (97%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.12 (n-BuOH/AcOH/H₂O, 2:1:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 3.75 – 3.69 (m, 3H, 4-, 5-, 6-H), 3.63 – 3.59 (m, 1H, 8-H), 3.22 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 7-H), 3.05 (dd, J = 13.1, 3.0 Hz, 1H, 9a-H), 2.63 (dd, J = 13.1, 9.3 Hz, 1H, 9b-H), 1.92 (dd, J = 13.0, 4.5 Hz, 1H, 3a-H), 1.62 (s, 3H, 11-H), 1.55 (t, J = 13.0 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 176.93 (C-1), 175.21 (C-10), 96.78 (C-2), 70.50 (C-7), 70.27 (C-6), 67.83 (C-8), 67.50 (C-4), 52.59 (C-5), 43.24 (C-9), 39.76 (C-3), 22.51 (C-11) ppm.

***N*-Aminoacetyl-D-neuraminsäure (Neu5AcNH₂) (185)**

Ansatz nach AAV 5b

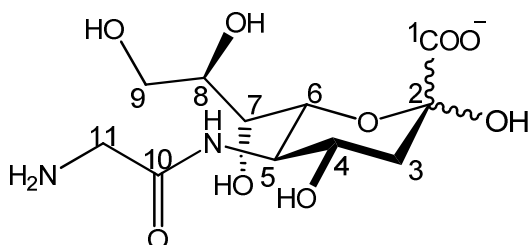
Neu5AcN₃ (172): 300 mg (0.852 mmol, 1 Äq.)

PPh₃: 882 mg (3.363 mmol, 4 Äq.)

MeOH/H₂O (10:0.5) : 45 mL

Ausbeute: 271 mg (92%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.07 (n-BuOH/AcOH/H₂O, 2:1:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 3.81 – 3.75 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.72 – 3.70 (m, 1H, 6-H), 3.56 (dd, J = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.49 – 3.48 (m, 1H, 8-H), 3.45 (dd, J = 11.9, 6.3 Hz, 1H,

9b-H), 3.25 – 3.22 (m, 2H, 7-, 11-H), 1.95 (dd, $J = 12.9, 4.8$ Hz, 1H, 3a-H), 1.57 (dd, $J = 12.8, 11.4$ Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 177.08$ (C-1), 174.61 (C-10), 96.80 (C-2), 70.68 (C-8), 70.52 (C-6), 68.88 (C-7), 67.60 (C-4), 63.63 (C-9), 52.62 (C-5), 43.56 (C-11), 39.81 (C-3) ppm.

N-Aminopentanoyl-D-neuraminsäure (Neu5PenNH₂) (186)

Ansatz nach AAV 5a

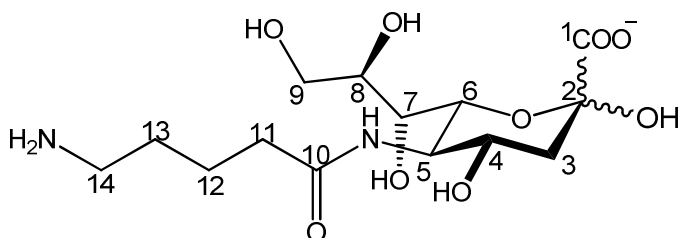
Neu5PenN₃ (177): 80 mg (0.193 mmol)

Pd/CaCO₃: 20.5 mg

H₂O (pH = 9.0, mit NH₄OH einstellen): 3 mL

Ausbeute: 60 mg (80%), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.08$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 40:40:5:15)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = 4.03 - 3.92$ (m, 2H, 4-, 6-H), 3.88 (t, $J = 10.0$, 1H, 5-H), 3.78 (dd, $J = 11.9, 2.7$ Hz, 1H, 9a-H), 3.71 (ddd, $J = 8.9, 6.0, 2.7$ Hz, 1H, 8-H), 3.58 (dd, $J = 11.8, 6.0$ Hz, 1H, 9b-H), 3.46 (dd, $J = 9.1, 0.9$ Hz, 1H, 7-H), 2.96 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, 14-H), 2.32 – 2.28 (m, 2H, 11-H), 2.17 (dd, $J = 13.1, 5.1$ Hz, 1H, 3a-H), 1.78 (dd, $J = 12.8, 11.6$ Hz, 1H, 3b-H), 1.64 (m, 4H, 12-, 13-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 181.89$ (C-1), 176.66 (C-10), 96.83 (C-2), 70.65 (C-4, -8), 68.96 (C-7), 67.59 (C-4), 63.57 (C-9), 52.62 (C-5), 39.95 (C-3), 39.53 (C-14), 35.60 (C-11), 26.73 (C-13), 22.58 (C-12) ppm.

N-Aminohexanoyl-D-neuraminsäure (Neu5HexNH₂) (187)

Ansatz I nach AAV 5a

Neu5HexN₃ (178): 782 mg (1.825 mmol)

Pd/CaCO₃: 196 mg

H₂O (pH = 9.0, mit NH₄OH einstellen): 25 mL

Ausbeute: 676 mg (92%), als farbloser Feststoff

R_f = 0.10 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 40:40:5:15)

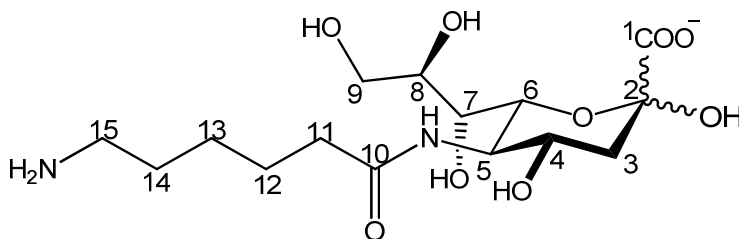
Ansatz I nach AAV 5b

Neu5HexN₃ (178): 60 mg (0.140 mmol, 1 Äq.)

PPh₃: 261 mg (0.885 mmol, 7 Äq.)

MeOH/H₂O (10:0.5) : 15 mL

Ausbeute: 17 mg (30%), als farbloser Feststoff



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 3.99 – 3.89 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.84 (t, J = 10.2 Hz, 1H, 5-H), 3.76 (dd, J = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.69 (ddd, J = 8.9, 6.1, 2.7 Hz, 1H, 8-H), 3.54 (dd, J = 11.9, 6.1 Hz, 1H, 9b-H), 3.43 (dd, J = 9.1, 1.0 Hz, 1H, 7-H), 2.92 (t, 2H, J = 7.5, 15-H), 2.26 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 11-H), 2.14 (dd, J = 12.9, 4.8 Hz, 1H, 3a-H), 1.76 (dd, J = 12.8, 11.6 Hz, 1H, 3b-H), 1.65 – 1.55 (m, 4H, 12-, 14-H), 1.32 (dd, J = 15.7, 7.6 Hz, 2H, 13-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 177.75 (C-1), 177.06 (C-10), 96.79 (C-2), 70.62 (C-6), 70.59 (C-8), 69.00 (C-7), 67.58 (C-4), 63.60 (C-9), 52.58 (C-5), 39.96 (C-3), 39.68 (C-15), 36.01 (C-11), 26.81 (C-12), 25.48 (C-14), 25.14 (C-13) ppm.

***N*-(4-(*N'*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl))-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure (188)**

Ansatz nach AAV 8

GalAc₄- β -N₃ (71): 62 mg (0.167 mmol, 1.2 Äq.) in 1 mL Aceton

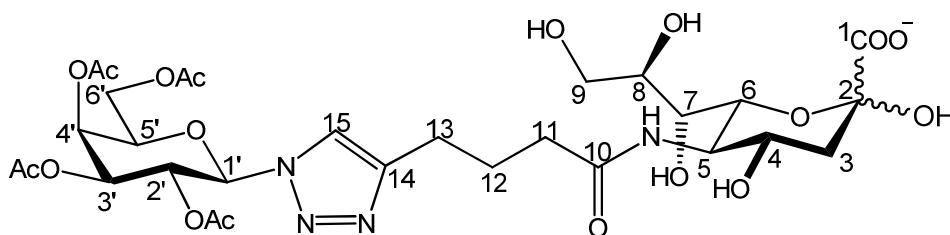
Neu5Hex (173): 50 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H_2O

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 35 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H_2O

Na-Ascorbat: 27 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H_2O

Ausbeute: 83 mg (80%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

R_f = 0.39 (n-BuOH/Aceton/AcOH/ H_2O , 40:40:5:15)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.08 (s, 1H, 15-H), 6.07 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 1'-H), 5.67 – 5.60 (m, 1H, 2'-H), 5.59 (dd, J = 3.3, 0.8 Hz, 1H, 4'-H), 5.44 (dd, J = 10.2, 3.3 Hz, 1H, 3'-H), 4.51 (dd, J = 7.0, 6.0 Hz, 1H, 5'-H), 4.28 (dd, J = 11.8, 5.0 Hz, 1H, 6'-a-H), 4.20 (dd, J = 11.8, 7.2 Hz, 1H, 6'-b-H), 4.02 – 3.91 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.91 – 3.85 (m, 1H, 5-H), 3.78 (dd, J = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.71 (ddd, J = 9.1, 6.3, 2.7 Hz, 1H, 8-H), 3.55 (dd, J = 11.9, 6.3 Hz, 1H, 9b-H), 3.46 (dd, J = 9.1, 0.9 Hz, 1H, 7-H), 2.78 – 2.65 (m, 2H, 13-H), 2.27 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 11-H), 2.24 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (dd, J = 12.9, 4.9 Hz, 1H, 3a-H), 2.03 (s, 3H, COCH_3), 2.00 (s, 3H, COCH_3), 1.96 – 1.90 (m, 2H, 12-H), 1.88 (s, 3H, COCH_3), 1.79 (dd, J = 12.9, 11.5 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 177.17 (C-1), 177.08 (C-10), 173.89, 173.60, 172.96, 172.40 (COCH₃), 148.46 (C-14), 122.97 (C-15), 96.82 (C-2), 85.57 (C-1'), 74.05 (C-5'), 71.42 (C-3'), 70.74 (C-6), 70.64 (C-8), 69.08 (C-7, -2'), 68.23 (C-4'), 67.59 (C-4), 63.68 (C-9), 62.46 (C-6'), 52.63 (C-5), 39.92 (C-3), 35.33 (C-11), 25.33 (C-12), 24.18 (C-13), 20.49, 20.38, 20.00 (COCH₃) ppm.

***N*-(4-(*N'*- β -D-Galactopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure (189)**

Ansatz nach AAV 8

Gal- β -N₃ (**73**): 31 mg (0.153 mmol, 1.1 Äq.) in 1 mL $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

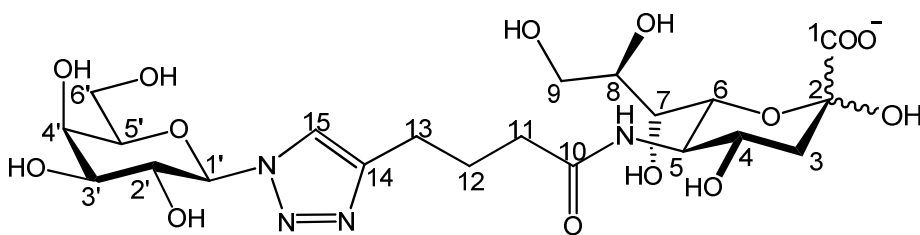
Neu5Hex (**173**): 50 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 35 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H_2O

Na-Ascorbat: 27 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H_2O

Ausbeute: 72 mg (88%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

R_f = 0.08 (n-Propanol/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$, 8:2:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.04 (s, 1H, 15-H), 5.61 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 1'-H), 4.16 (t, J = 9.5 Hz, 1H, 2'-H), 4.04 (d, J = 3.2 Hz, 1H, 4'-H), 4.01 – 3.92 (m, 3H, 6-, 4-, 5'-H), 3.88 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 5-H), 3.83 (dd, J = 9.8, 3.3 Hz, 1H, 3'-H), 3.76 (dd, J = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.74 (d, J = 6.1 Hz, 2H, 6'-H), 3.72 – 3.67 (m, 1H, 8-H), 3.55 (dd, J = 11.9, 6.2 Hz, 1H, 9b-H), 3.46 (dd, J = 9.1, 1.0 Hz, 1H, 7-H), 2.74 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 11-H), 2.34 – 2.23 (m, 2H, 13-H), 2.17 (dd, J = 13.0, 4.9 Hz, 1H, 3a-H), 2.00 – 1.90 (m, 2H, 12-H), 1.78 (dd, J = 12.8, 11.6 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 177.28 (C-1), 176.65 (C-10), 148.46 (C-14), 122.67 (C-15), 96.71 (C-2), 88.30 (C-1'), 78.62 (C-5'), 73.38 (C-3'), 70.70 (C-4, -8), 70.09 (C-2'), 68.97 (C-4', -7), 67.48 (C-6), 63.61 (C-9), 61.23 (C-6'), 52.58 (C-5), 39.83 (C-3), 35.32 (C-13), 25.21 (C-12), 24.19 (C-11) ppm.

***N*-(4-(*N'*-(Hepta-*O*-acetyl- β -D-lactosyl))-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure (190)**

Ansatz nach AAV 8

LacAc $_7$ - β -N $_3$ (72): 110 mg (0.167 mmol, 1.2 Äq.) in 1 mL Aceton

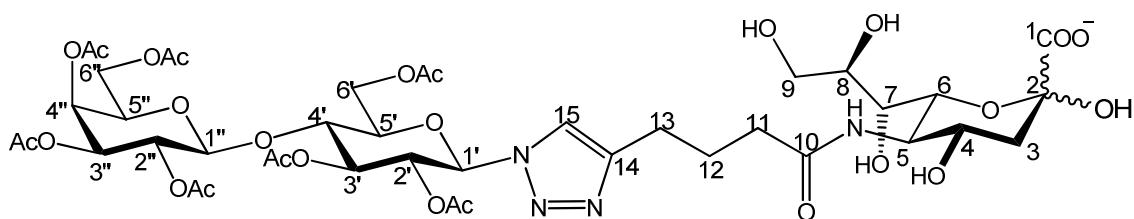
Neu5Hex (173): 50 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H_2O

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 35 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H_2O

Na-Ascorbat: 27 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H_2O

Ausbeute: 286 mg (74%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

R_f = 0.38 (n-BuOH/Aceton/AcOH/ H_2O , 40:40:5:15)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.02 (d, J = 11.9 Hz, 1H, 15-H), 6.06 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 1'-H), 5.49 – 5.40 (m, 3H, 2', 5'-, 4'-H), 5.16 (dd, J = 10.3, 3.4 Hz, 1H, 3'-H), 5.01 (dd, J = 10.2, 7.9 Hz, 1H, 2'-H), 4.84 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1''-H), 4.53 (d, J = 10.5 Hz, 1H, 6'a-H), 4.29 (t, J = 9.1 Hz, 1H, 3'-H), 4.23 – 4.13 (m, 5H, 6''-, 5'-, 6'b-, 4'-H), 4.02 – 3.92 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.91 – 3.85 (m, 1H, 5-H), 3.78 (dd, J = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.71 (ddd, J = 9.1, 6.3, 2.7 Hz, 1H, 8-H), 3.56 (dd, J = 11.8, 6.3 Hz, 1H, 9b-H), 3.48 – 3.43 (m, 1H, 7-H), 2.72 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 13-H), 2.26 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 11-H), 2.18 – 2.16 (m, 1H, 3a-H), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 2.11 (s, 3H, COCH_3), 2.10 (s, 3H, COCH_3), 2.09 (s, 3H, COCH_3), 2.09 (s,

3H, COCH₃), 1.97 (s, 3H, COCH₃), 1.96 – 1.89 (m, 2H, 12-H), 1.87 (s, 3H, COCH₃), 1.79 (dd, $J = 12.5, 11.8$ Hz, 1H, 3b-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): $\delta = 177.13$ (C-1), 177.09 (C-10), 174.00, 173.87, 173.62, 173.29, 173.11, 172.99, 172.17 (COCH₃), 148.46 (C-14), 122.79 (C-15), 100.68 (C-1'), 96.82 (C-2), 85.14 (C-1''), 75.66 (C-5'), 75.56 (C-3'), 73.53 (C-5''), 71.68 (C-3''), 71.36 (C-2'), 70.84 (C-4'), 70.73 (C-6), 70.65 (C-8), 70.23 (C-8'), 69.05 (C-7), 68.25 (C-4''), 67.59 (C-4), 63.69 (C-9), 62.69 (C-6), 62.22 (C-12), 52.63 (C-5), 39.93 (C-3), 35.29 (C-11), 25.26 (C-12), 24.15 (C-13), 20.86, 20.57, 20.35, 19.95 (COCH₃) ppm.

N-(4-(*N'*- β -D-Lactosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure (191)

Ansatz nach AAV 8

Lac- β -N₃ (74): 56 mg (0.153 mmol, 1.1 Äq.) in 1 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

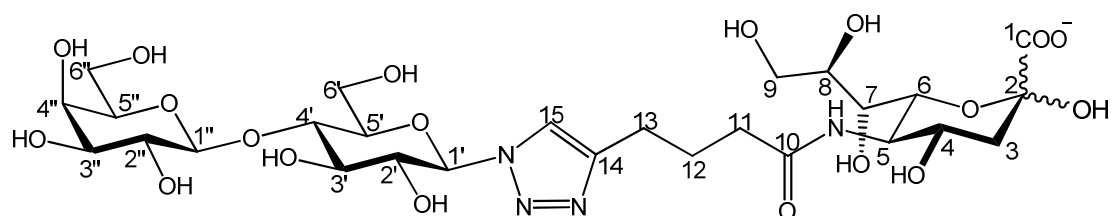
Neu5Hex (173): 50 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

CuSO₄·5H₂O: 35 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H₂O

Na-Ascorbat: 27 mg (0.139 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H₂O

Ausbeute: 98 mg (94%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.01$ (n-Propanol/H₂O/NH₃, 8:2:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 7.92$ (s, 1H, 15-H), 5.60 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, 1'-H), 4.36 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 1''-H), 3.95 – 3.77 (m, 6H, 2', 4-, 6-, 6'a-, 5-, 4''-H), 3.77 – 3.70 (m, 4H, 4', 6b-, 5', 5''-H), 3.70 – 3.57 (m, 5H, 9a-, 6''-, 3', 8-H), 3.54 (dd, $J = 10.0, 3.4$ Hz, 1H, 3''-H), 3.49 – 3.40 (m, 2H, 9b-, 2''-H), 3.36 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, 7-H), 2.64 (t, $J = 7.3$ Hz,

2H, 13-H), 2.24 – 2.13 (m, 2H, 11-H), 2.07 (dd, $J = 13.0, 4.8$ Hz, 1H, 3a-H), 1.91 – 1.79 (m, 2H, 12-H), 1.75 – 1.64 (m, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 177.25$ (C-1), 176.73 (C-10), 137.94 (C-14), 122.90 (C-15), 103.30 (C-1'), 96.72 (C-2), 87.53 (C-1'), 78.06 (C-4'), 77.76 (C-5'), 75.79 (C-3'), 74.96 (C-5'), 72.92 (C-3'), 72.35 (C-2'), 71.37 (C-2'), 70.68 (C-6), 70.65 (C-8), 68.98 (C-10, -7), 67.51 (C-4), 63.61 (C-9), 61.46 (C-12'), 60.16 (C-6'), 52.59 (C-5), 39.84 (C-3), 35.31 (C-11), 25.19 (C-12), 24.17 (C-13) ppm.

***N*-(6-(4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure (192)**

Ansatz nach AAV 8

GalAc₄- β -prop (58): 65 mg (0.176 mmol, 1.5 Äq.) in 600 μL Aceton

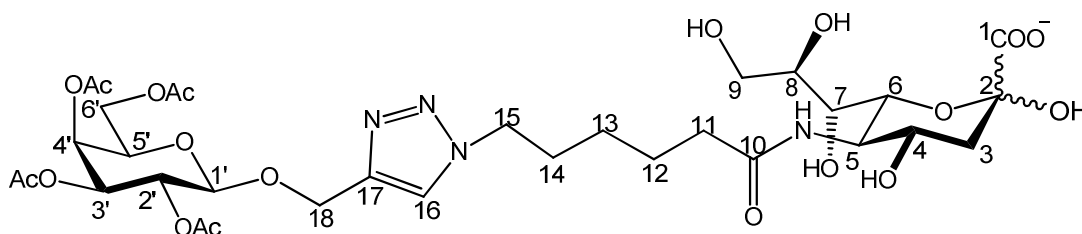
Neu5HexN₃ (178): 50 mg (0.117 mmol, 1 Äq.) in 600 μL H₂O

CuSO₄·5H₂O: 29 mg (0.117 mmol, 1 Äq.) in 500 μL H₂O

Na-Ascorbat: 23 mg (0.117 mmol, 1 Äq.) in 500 μL H₂O

Ausbeute: 77 mg (81%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.57$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = 8.00$ (s, 1H, 16-H), 5.41 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, 4'-H), 5.16 (dd, $J = 10.3, 3.4$ Hz, 1H, 3'-H), 5.01 (dd, $J = 10.2, 8.1$ Hz, 1H, 2'-H), 4.91 - 4.80 (m, 3H, 18a-, 1'-, 18b-H), 4.40 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, 15-H), 4.18 (dd, $J = 12.9, 7.8$ Hz, 3H, 5'-, 6'-H), 4.01 – 3.90 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.86 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H, 5-H), 3.78 (dd, $J = 11.8, 2.7$ Hz, 1H, 9a-H),

3.71 (ddd, $J = 9.0, 6.3, 2.7$ Hz, 1H, 8-H), 3.55 (dd, $J = 11.8, 6.3$ Hz, 1H, 9b-H), 3.44 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, 7-H), 2.24 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 11-H), 2.16 (d, $J = 5.4$ Hz, 4H, 3a-, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 1.96 (s, 3H, COCH₃), 1.94 (s, 3H, COCH₃), 1.91 – 1.85 (m, 2H, 14-H), 1.78 (dd, $J = 12.8, 11.7$ Hz, 1H, 3b-H), 1.65 – 1.51 (m, 2H, 12-H), 1.25 (dt, $J = 15.4, 7.7$ Hz, 2H, 13-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): $\delta = 177.75$ (C-1), 177.08 (C-10), 173.91, 173.64, 173.13, 173.04 (COCH₃), 143.68 (C-17), 125.67 (C-16), 100.20 (C-1'), 96.82 (C-2), 71.46 (C-3'), 71.05 (C-5'), 70.69 (C-6, -8), 69.77 (C-2'), 69.08 (C-7), 68.43 (C-4'), 67.57 (C-4), 63.70 (C-9), 62.82 (C-18), 62.33 (C-6'), 52.59 (C-5), 50.64 (C-15), 39.95 (C-3), 36.13 (C-11), 29.51 (C-14), 25.59 (C-13), 25.13 (C-12), 20.56, 20.49, 20.36 (COCH₃) ppm.

***N*-(6-(4-(β -D-galactopyranosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure (193)**

Ansatz nach AAV 8

Gal- β -prop (59): 38 mg (0.176 mmol, 1.5 Äq.) in 400 μ L ^tBuOH/H₂O (1:1)

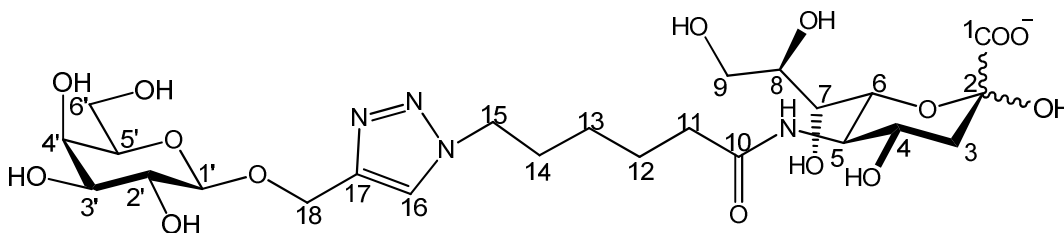
Neu5HexN₃ (178): 50 mg (0.117 mmol, 1 Äq.) in 400 μ L ^tBuOH/H₂O (1:1)

CuSO₄·5H₂O: 29 mg (0.117 mmol, 1 Äq.) in 400 μ L H₂O

Na-Ascorbat: 23 mg (0.117 mmol, 1 Äq.) in 400 μ L H₂O

Ausbeute: 72 mg (95%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.14$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.01 (s, 1H, 16-H), 4.94 (d, J = 12.6 Hz, 1H, 18a-H), 4.81 (d, J = 12.6 Hz, 1H, 18b-H), 4.42 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.38 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 15-H), 4.00 – 3.89 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.89 – 3.83 (m, 2H, 4'-, 5-H), 3.77 (dd, J = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.73 – 3.68 (m, 3H, 6'-, 8-H), 3.67 – 3.62 (m, 1H, 5'-H), 3.59 – 3.53 (m, 2H, 3'-, 9b-H), 3.47 (dd, J = 9.8, 7.9 Hz, 1H, 2'-H), 3.43 (d, J = 9.1 Hz, 1H, 7-H), 2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 11-H), 2.15 (dd, J = 12.9, 4.8 Hz, 1H, 3a-H), 1.91 – 1.82 (m, 2H, 14-H), 1.77 (t, J = 12.2 Hz, 1H, 3b-H), 1.57 (dt, J = 14.9, 7.5 Hz, 2H, 12-H), 1.29 – 1.16 (m, 2H, 13-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 177.86 (C-1), 177.10 (C-10), 144.02 (C-17), 125.70 (C-16), 102.37 (C-1'), 96.83 (C-2), 75.61 (C-5'), 73.13 (C-3'), 71.06 (C-2'), 70.68 (C-8, -6), 69.00 (C-7, -4'), 67.55 (C-4), 63.67 (C-9), 62.29 (C-18), 61.34 (C-6'), 52.57 (C-5), 50.64 (C-15), 39.94 (C-3), 36.13 (C-11), 29.42 (C-14), 25.54 (C-13), 25.13 (C-12) ppm.

***N*-(6-(4-(Hepta-*O*-acetyl- β -D-lactosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure (194)**

Ansatz nach AAV 8

LacAc₇- β -prop (60): 354 mg (0.525 mmol, 1.5 Äq.) in 3 mL Aceton

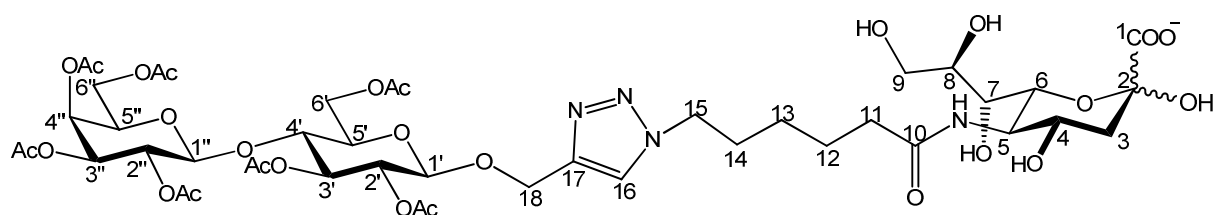
Neu5HexN₃ (178): 150 mg (0.35 mmol, 1 Äq.) in 3 mL H₂O

CuSO₄·5H₂O: 87 mg (0.35 mmol, 1 Äq.) in 3 mL H₂O

Na-Ascorbat: 69 mg (0.35 mmol, 1 Äq.) in 3 mL H₂O

Ausbeute: 286 mg (74%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

R_f = 0.49 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.98 (s, 1H, 16-H), 5.37 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, 4''-H), 5.18 – 5.11 (m, 2H, 3', 3''-H), 4.96 (dd, *J* = 10.3, 7.9 Hz, 1H, 2''-H), 4.89 – 4.77 (m, 4H, 6''-, 1'-, 2'-H), 4.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, 1''-H), 4.45 (dd, *J* = 12.1, 1.6 Hz, 1H, 6'a-H), 4.39 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, 15-H), 4.20 – 4.10 (m, 4H, 6'b-, 5''-, 18-H), 4.05 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, 4'-H), 4.01 – 3.91 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.88 – 3.84 (m, 2H, 5'-, 5-H), 3.78 (dd, *J* = 11.8, 2.8 Hz, 1H, 9a-H), 3.71 (ddd, *J* = 9.0, 6.3, 2.7 Hz, 1H, 8-H), 3.55 (dd, *J* = 11.8, 6.3 Hz, 1H, 9b-H), 3.44 (dd, *J* = 9.0, 0.9 Hz, 1H, 7-H), 2.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 11-H), 2.16 (s, 4H, 3b-H, COCH₃), 2.14 (s, 3H, COCH₃), 2.08 (s, 3H, COCH₃), 2.06 (s, 6H, COCH₃), 1.96 (s, 3H, COCH₃), 1.95 (s, 3H, COCH₃), 1.90 – 1.83 (m, 2H, 14-H), 1.78 (dd, *J* = 12.8, 11.7 Hz, 1H, 3b-H), 1.58 (dt, *J* = 15.2, 7.6 Hz, 2H, 12-H), 1.24 (dt, *J* = 15.4, 7.8 Hz, 2H, 13-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 177.76 (C-1), 177.03 (C-10), 174.08, 173.86, 173.63, 173.40, 173.10, 172.99, 172.90 (COCH₃), 143.29 (C-17), 125.54 (C-16), 100.54 (C-1'), 99.81 (C-1'), 96.83 (C-2), 75.78 (C-4'), 73.64 (C-3'), 72.67 (C-5'), 71.98 (C-2'), 71.66 (C-3'), 70.76 (C-8), 70.73 (C-6), 70.70 (C-5'), 70.22 (C-2'), 69.07 (C-7), 68.23 (C-4'), 67.57 (C-4), 63.70 (C-9), 62.87 (C-6'), 62.71 (C-6'), 62.20 (C-18), 52.60 (C-5), 50.63 (C-15), 39.95 (C-3), 36.13 (C-11), 29.53 (C-14), 25.60 (C-13), 25.13 (C-12), 20.85, 20.64, 20.57, 20.54, 20.45, 20.35 (COCH₃) ppm.

***N*-(6-(4-(β-D-Lactosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure (195)**

Ansatz nach AAV 8

Lac-β-prop (**61**): 80 mg (0.21 mmol, 1.5 Äq.) in 2 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

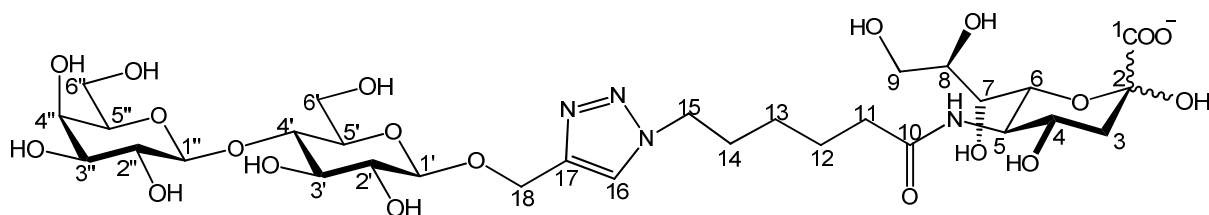
Neu5HexN₃ (**178**): 60 mg (0.14 mmol, 1 Äq.) in 2 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

CuSO₄·5H₂O: 34.7 mg (0.14 mmol, 1 Äq.) in 2 mL H₂O

Na-Ascorbat: 27.6 mg (0.14 mmol, 1 Äq.) in 2 mL H₂O

Ausbeute: 110 mg (85%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

R_f = 0.13 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.02 (s, 1H, 16-H), 4.94 (d, J = 12.6 Hz, 1H, 18a-H), 4.84 (d, J = 12.6 Hz, 1H, 18b-H), 4.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.40 (t, J = 6.8 Hz, 3H, 1''-, 15-H), 4.02 – 3.90 (m, 3H, 4-, 6-, 6'a-H), 3.88 – 3.84 (m, 2H, 4''-, 5-H), 3.80 – 3.76 (m, 2H, 9a-, 6'b-H), 3.75 – 3.65 (m, 4H, 6''-, 8-, 5'-H), 3.65 – 3.53 (m, 5H, 3'-, 4'-, 3''-, 5'-, 9b-H), 3.50 (dd, J = 10.0, 7.8 Hz, 1H, 2'-H), 3.44 (dd, J = 9.1, 0.7 Hz, 1H, 7-H), 3.30 (t, J = 8.5 Hz, 1H, 2'-H), 2.24 (q, J = 7.0 Hz, 2H, 11-H), 2.17 (dd, J = 12.9, 4.9 Hz, 1H, 3a-H), 1.93 – 1.84 (m, 2H, 14-H), 1.78 (dd, J = 12.8, 11.6 Hz, 1H, 3b-H), 1.59 (dt, J = 15.1, 7.6 Hz, 2H, 12-H), 1.25 (dt, J = 15.3, 7.7 Hz, 2H, 13-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 177.84 (C-1), 177.10 (C-10), 143.85 (C-17), 125.71 (C-16), 103.34 (C-1'), 101.72 (C-1'), 96.83 (C-2), 78.71 (C-4'), 75.75 (C-5'), 75.21 (C-5'), 74.74 (C-3'), 73.13 (C-3'), 72.94 (C-2'), 71.36 (C-2'), 70.71 (C-8), 70.68 (C-6), 69.06 (C-7), 68.97 (C-4'), 67.58 (C-4), 63.68 (C-9), 62.45 (C-18), 61.42 (C-6'), 60.48 (C-6'), 52.57 (C-5), 50.65 (C-15), 39.95 (C-3), 36.13 (C-11), 29.43 (C-14), 25.54 (C-13), 25.13 (C-12) ppm.

***N*-(4-(1-(7-Hydroxy)-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl))-butanoyl-D-neuraminsäure (196)**

Ansatz nach AAV 8

3-Azido-7-hydroxycumarin: 85 mg (0.416 mmol, 1 Äq.) in 3.5 mL $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

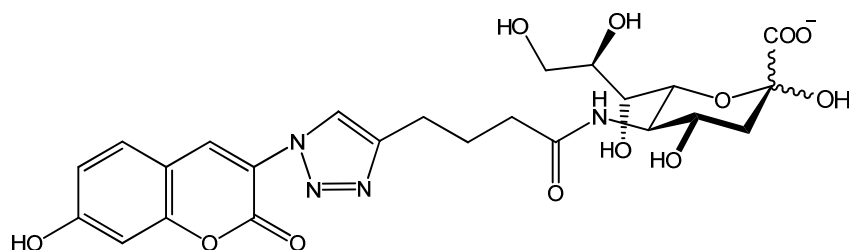
Neu5Hex (**173**): 150 mg (0.416 mmol, 1 Äq.) in 3.5 mL $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 104 mg (0.416 mmol, 1.2 Äq.) in 3.5 mL H_2O

Na-Ascorbat: 124 mg (0.416 mmol, 1.2 Äq.) in 3.5 mL H_2O

Ausbeute: 156 mg (60%), als gelbgrüner Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über RP-C18-Kieselgel

R_f = 0.34 (n-Propanol/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$, 8:2:1)



ESI-MS: $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{12}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, berechnet 609.1, gemessen 609.3;

$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{NaO}_{12}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, berechnet 587.2, gemessen 587.3;

$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_{12}$ $[\text{M} - \text{Na}]^+$, berechnet 563.16, gemessen 563.2;

$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{NaO}_{12}$ $[\text{M} - \text{H}]^+$, berechnet 585.15, gemessen 585.1

***N*-(4-(1-(7-Diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-butanoyl-D-neuraminsäure (197)**

Ansatz nach AAV 8

Et₂NCoum-N₃ (**38**): 72 mg (0.278 mmol, 1 Äq.) in 3 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

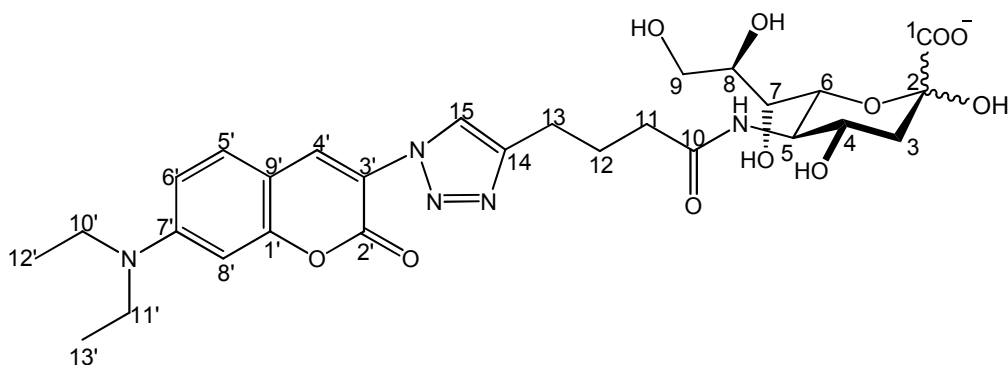
Neu5Hex (**173**): 120 mg (0.333 mmol, 1.2 Äq.) in 3 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

CuSO₄·5H₂O: 83 mg (0.332 mmol, 1.2 Äq.) in 3 mL H₂O

Na-Ascorbat: 66 mg (0.332 mmol, 1.2 Äq.) in 3 mL H₂O

Ausbeute: 84 mg (47%), als gelbgrüner Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über RP-C18-Kieselgel

$R_f = 0.41$ (n-Propanol/H₂O/NH₃, 8:2:1)



^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 8.41 (s, 1H, 4'-H), 8.28 (s, 1H, 15-H), 7.62 (d, J = 8.9 Hz, 1H, 5'-H), 6.81 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 6'-H), 6.65 (s, 1H, 8'-H), 3.85 – 3.78 (m, 3H, 4-, 6-, 5-H), 3.55 – 3.41 (m, 8, 9a-, 10'-, 11'-, 8-, 7-, 9b-H), 2.71 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 13-H), 2.50 (m, 1H, 3a-H), 2.24 (t, J = 7.1 Hz, 2H, 11-H), 1.89 (m, 2H, 12-H), 1.91 (m, 1H, 3b-H), 1.15 (t, J = 6.9 Hz, 2H, 12'-, 13'-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ = 204.83 (C-1), 173.62 (C-10), 167.32 (C-1'), 155.94 (C-7'), 151.74 (C-14), 146.80 (C-3'), 137.05 (C-4'), 130.84 (C-5'), 123.27 (C-15), 116.74 (C-9'), 110.35 (C-6'), 106.84 (C-2), 96.71 (C-8'), 71.11 (C-6), 70.37 (C-8), 69.13 (C-7), 66.56 (C-4), 63.78 (C-9), 53.01 (C-5), 44.56 (C-10', -11'), 41.15 (C-3), 39.33 (C-11), 25.58 (C-12), 24.78 (C-13), 12.64 (C-12', -13') ppm.

ESI-MS: $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{11}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, berechnet 664.2, gemessen 664.4;

$\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{NaO}_{11}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, berechnet 642.2, gemessen 642.4;

$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_{11}$ $[\text{M} - \text{Na}]^+$, berechnet 618.2, gemessen 618.2

***N*-(2-(4-(3-(4-(3,6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-9-yl)-3-sulfonatophenyl-sulfonamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-acetyl-D-neuraminsäure (198)**

Ansatz nach AAV 8

Roh-Pentin (6): 8 mg (0.013 mmol, 1 Äq.) in 500 μL $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

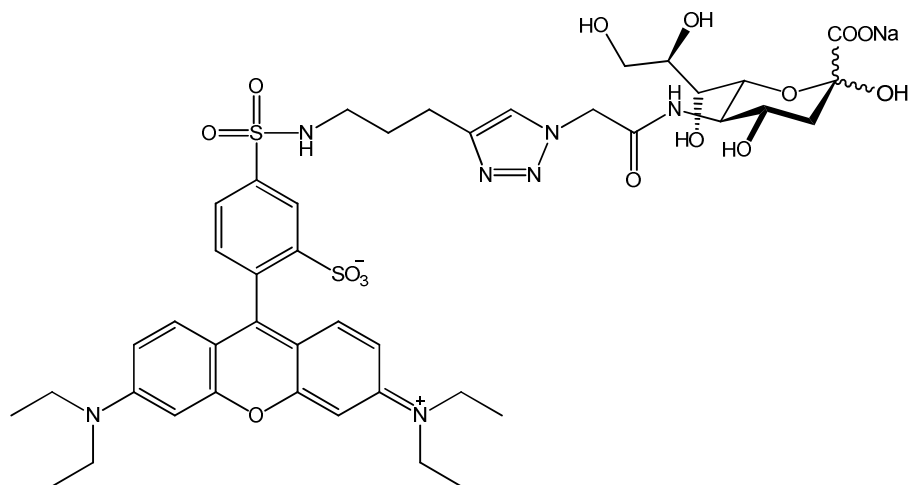
Neu5AcN₃ (172): 5.8 mg (0.016 mmol, 1.2 Äq.) in 500 μL $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 3.2 mg (0.013 mmol, 1 Äq.) in 500 μL H_2O

Na-Ascorbat: 2.6 mg (0.013 mmol, 1 Äq.) in 500 μL H_2O

Ausbeute: 6.5 mg (49%), als roter Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Flash-Kieselgel mit n-Propanol/H₂O/NH₃ (8:2:1)

$R_f = 0.56$ (n-Propanol/H₂O/NH₃, 6:2:1)



ESI-MS: C₄₃H₅₄N₇Na₂O₁₅S₂ [M + Na]⁺, berechnet 1018.3, gemessen 1018.4;

C₄₃H₅₅N₇NaO₁₅S₂ [M + H]⁺, berechnet 996.3, gemessen 996.6;

C₄₃H₅₃N₇NaO₁₅S₂ [M - Na]⁺, berechnet 994.3, gemessen 994.3

***N*-(6-(4-(3-(4-(3,6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-9-yl)-3-sulfonatophenyl-sulfonamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-hexanoyl-D-neuraminsäure (199)**

Ansatz nach AAV 8

Roh-Pentin (**6**) : 27 mg (0.043 mmol, 1.5 Äq.) in 1 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

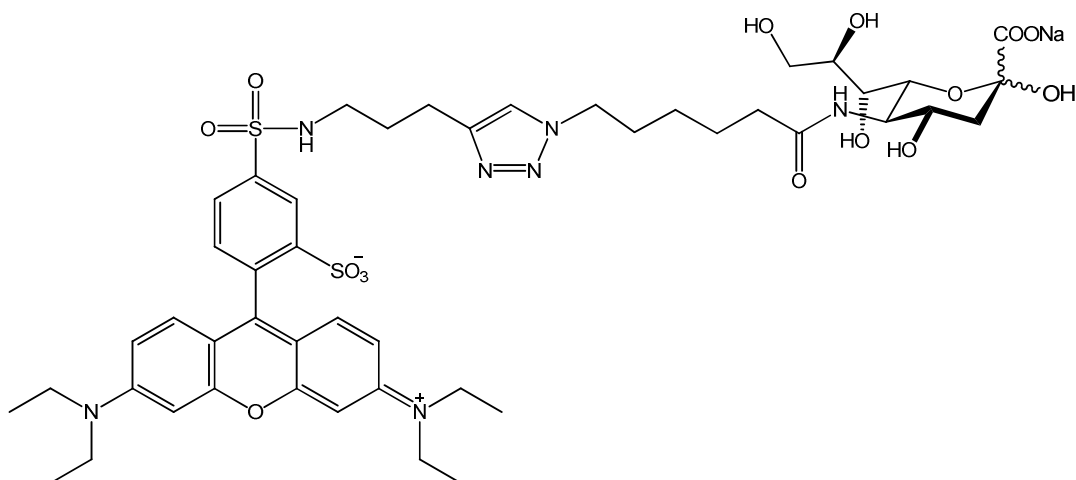
Neu5HexN₃ (**178**): 12.4 mg (0.029 mmol, 1 Äq.) in 1 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

CuSO₄·5H₂O: 7.2 mg (0.029 mmol, 1 Äq.) in 0.8 mL H₂O

Na-Ascorbat: 5.7 mg (0.029 mmol, 1 Äq.) in 0.8 mL H₂O

Ausbeute: 21 mg (69%), als gelbgrüner Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über RP-C18-Kieselgel

$R_f = 0.42$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



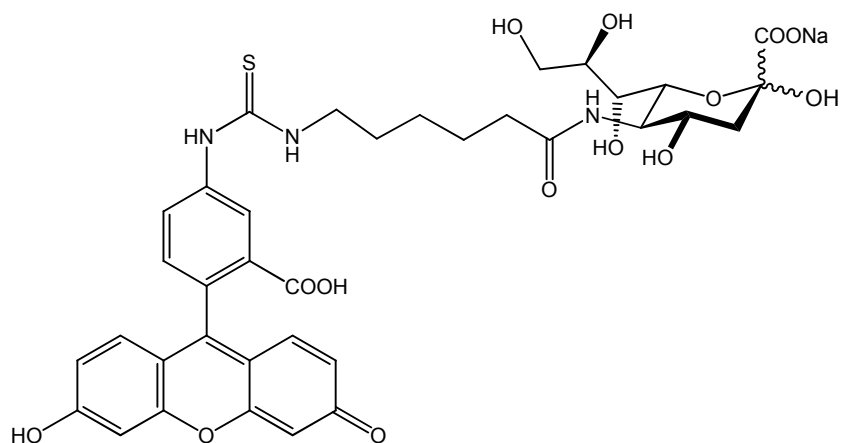
ESI-MS: C₄₇H₆₂N₇Na₂O₁₅S₂ [M + Na]⁺, berechnet 1074.4, gemessen 1074.4;

C₄₇H₆₃N₇NaO₁₅S₂ [M + H]⁺, berechnet 1052.4, gemessen 1052.4;

***N*-(2-(3-(3-carboxy-4-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)phenyl)thioureido))- hexanoyl-D-neuraminsäure (200)**

Eine Mischung von 5.8 mg (0.014 mmol, 1 Äq.) Neu5HexNH₂ (**187**) und 6.7 mg (0.017 mmol, 1.2 Äq.) FITC in 350 µL NaHCO₃-Lösung (0.15 M, pH = 9.0) wird bei 37 °C über Nacht gerührt, bis keine weitere Umsetzung beobachtet wird. Anschließend wird die Reaktionsmischung im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird über Flash-Kieselgel mit n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O (35:35:7:23) chromatographiert. Man erhält 10 mg (85%) gelben Feststoff.

$R_f = 0.55$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 35:35:7:23)



ESI-MS: $C_{36}H_{38}N_3NaO_{14}S_1$ [M], berechnet 791.2, gemessen 791.2

$C_{36}H_{38}N_3Na_2O_{14}S_1$ [M + Na]⁺, berechnet 814.18, gemessen 814.2;

2-Cytidin-5'-monophospho-*N*-acetyl-D-neuraminsäure (201)

Ansatz nach AAV 10

Neu5Ac: 200 mg (0.64 mmol, 1 Äq.)

CTP: 311 mg (0.64 mmol, 1 Äq.)

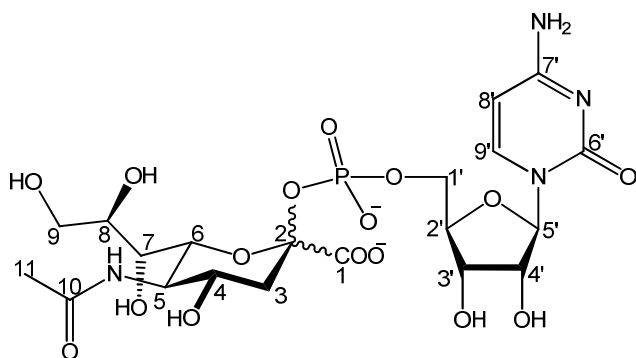
Anorganische Pyrophosphatase: 64 μ L (32 U)

CSS: 37 mg

Puffer (50 mM Tris, 50 mM $MgCl_2$, pH = 8.5): 8 mL

Ausbeute: 299 mg (71%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

R_f = 0.12 (n-Propanol/ H_2O / NH_3 , 8:2:1)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 7.98 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 9'-H), 6.09 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 8'-H), 5.96 (d, J = 3.8 Hz, 1H, 5'-H), 4.29 (m, 2H, 3'-, 4'-H), 4.23 (m, 1H, 2'-H), 4.13 (qd, 1H, 1'a-H), 4.04 – 3.99 (m, 2H, 1'b-, 4-H), 3.96 (dd, J = 10.4, 1.1 Hz, 1H, 6-H), 3.89 (t, J = 10.1 Hz, 1H, 5-H), 3.82 (dd, J = 11.8, 2.7 Hz, 1H, 9a-H), 3.73 (m, 1H, 8-H), 3.59 (dd, J = 11.9, 6.5 Hz, 1H, 9b-H), 3.49 (dd, J = 9.1, 1.1 Hz, 1H, 7-H), 2.19 (dd, J = 12.9, 4.9 Hz, 1H, 3a-H), 2.03 (s, 3H, 11-H), 1.80 (dd, J = 12.9, 11.8 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 177.09 (C-1), 175.16 (C-10), 166.47 (C-7'), 158.02 (C-6'), 142.09 (C-9'), 96.92 (C-8'), 96.79 (C-2), 89.61 (C-5'), 83.53 (C-2'), 74.69 (C-4'), 70.72 (C-8), 70.62 (C-6), 69.90 (C-3'), 68.96 (C-7), 67.68 (C-4), 63.80 (C-1'), 63.76 (C-9), 54.30 (C-5), 39.77 (C-3), 22.50 (C-11) ppm.

ESI-MS: $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{16}\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, berechnet 659.41, gemessen 659.4

2-Cytidin-5'-monophospho-9-azido -D-galacto-non-2-ulopyranosonsäure (202)

Ansatz nach AAV 10

KDN-9N₃ (**161**): 50 mg (0.13 mmol, 1 Äq.)

CTP: 100 mg (0.17 mmol, 1.3 Äq.)

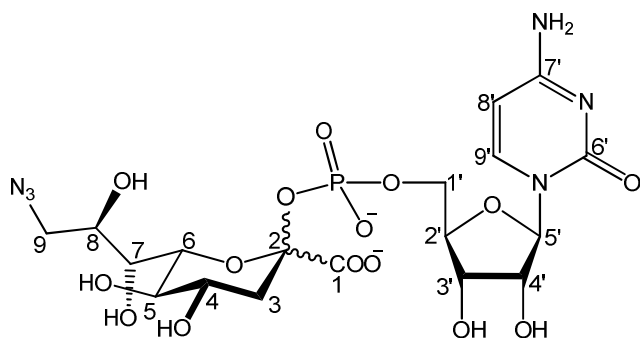
Anorganische Pyrophosphatase: 5 μL (10 U)

CSS: 40 mg

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl_2 , pH = 8.5): 3 mL

Ausbeute: 41 mg (49%), als farbloser Feststoff nach zweimaliger säulenchromatographischer Aufreinigung über Bio-Gel P2

$R_f = 0.21$ (n-Propanol/H₂O/NH₃, 8:2:1)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.97 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 9'-H), 6.12 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 8'-H), 5.93 (d, J = 4.3 Hz, 1H, 5'-H), 4.29 (m, 1H, 3'-H), 4.26 (m, 1H, 4'-H), 4.20 (m, 2H, 2'-, 1'-a-H), 4.13 (m, 1H, (m, 1H, 1'-b-H), 4.05 – 3.95 (m, 3H, 7-, 6-, 4-H), 3.73 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 5-H), 3.62 (dd, J = 13.0, 2.5 Hz, 1H, 9a-H), 3.54 (m, 1H, 8-H), 3.48 (dd, J = 13.2, 6.2 Hz, 1H, 9b-H), 2.38 (dd, J = 13.1, 4.8 Hz, 1H, 3a-H), 1.55 (dd, J = 13.0, 11.6 Hz, 1H, 3b-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 177.09 (C-1), 175.16 (C-10), 166.47 (C-7'), 158.02 (C-6'), 142.55 (C-9'), 96.92 (C-8'), 96.79 (C-2), 89.49 (C-5'), 83.27 (C-2'), 74.79 (C-4'), 73.21 (C-6), 70.28 (C-8), 69.78 (C-3'), 69.36 (C-5), 69.01 (C-7), 68.92 (C-4), 65.24 (C-1'), 53.67 (C-9), 45.62 (C-3) ppm.

2-Cytidin-5'-monophospho-*N*-acetyl-9-azido-D-neuraminsäure (203)

Ansatz nach AAV 10

Neu5Ac-9N₃ (**162**): 63 mg (0.176 mmol, 1 Äq.)

CTP: 87 mg (0.176 mmol, 1 Äq.)

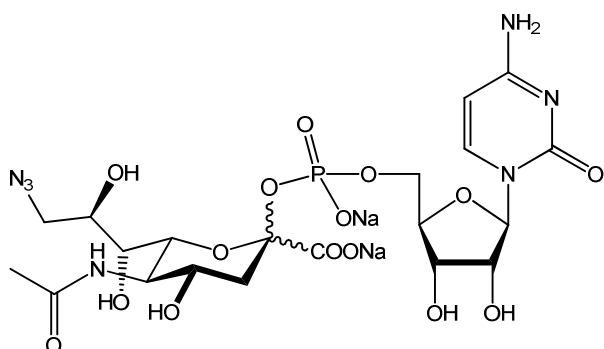
Anorganische Pyrophosphatase: 26 μ L (13U)

CSS: 10 mg

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 3 mL

Ausbeute: 126 mg (quantitativ umgesetzt), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.23$ (n-Propanol/H₂O/NH₃ , 8:2:1)



ESI-MS: C₂₀H₂₉N₇Na₂O₁₅P [M+H]⁺: berechnet 684.1, gemessen 684.3;

C₂₀H₂₇N₇Na₄O₁₅P [M+2Na-H]⁺, berechnet 728.1, gemessen 728.2

2-Cytidin-5'-monophospho-*N*-azidoacetyl-D-neuraminsäure (209)

Ansatz nach AAV 10

Neu5AcN₃ (172): 141 mg (0.400 mmol, 1 Äq.)

CTP: 193.5 mg (0.400 mmol, 1 Äq.)

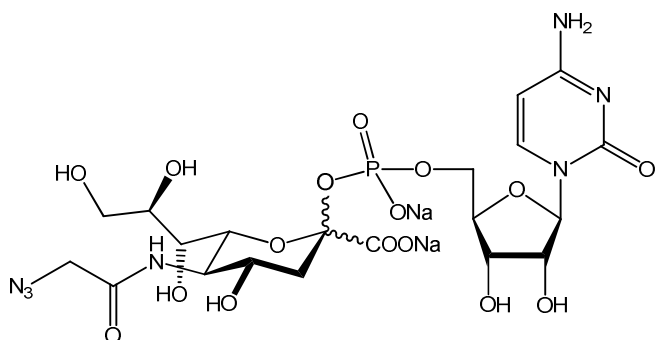
Anorganische Pyrophosphatase: 20 µL (8 U)

CSS: 15 mg

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 8 mL

Ausbeute: 286 mg (quantitativ umgesetzt), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.15$ (n-Propanol/H₂O/NH₃ , 8:2:1)



ESI-MS: $C_{20}H_{28}N_7Na_2O_{16}P$ [M], berechnet 699.11, gemessen 699.1;

$C_{20}H_{28}N_7Na_3O_{16}P$ [M+Na]⁺, berechnet 722.10, gemessen 722.2

2-Cytidin-5'-monophospho-*N*-(hex-5-ynol)-D-neuraminsäure (210)

Ansatz nach AAV 10

Neu5Hex (173): 179 mg (0.497 mmol, 1 Äq.)

CTP: 240 mg (0.497 mmol, 1 Äq.)

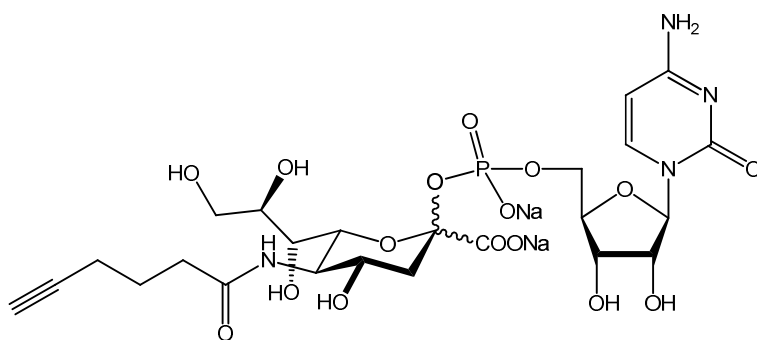
Anorganische Pyrophosphatase: 60 μ L (30 U)

CSS: 45 mg

Puffer (50 mM Tris, 50 mM $MgCl_2$, pH = 8.5): 10 mL

Ausbeute: 374 mg (quantitativ umgesetzt), als farbloser Feststoff

R_f = 0.18 (n-Propanol/ H_2O/NH_3 , 8:2:1)



ESI-MS: $C_{24}H_{33}N_4Na_3O_{16}P$ [M+Na]⁺, berechnet 733.13, gemessen 733.3

2-Cytidin-5'-monophospho-*N*-aminoacetyl-D-neuraminsäure (215)

Ansatz I nach **AAV 10**

Neu5AcNH₂ (**185**): 50 mg (0.144 mmol, 1 Äq.)

CTP: 84 mg (0.17 mmol, 1.2 Äq.)

Anorganische Pyrophosphatase: 16 µL (8 U)

CSS: 30 mg

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 1.5 mL

Ausbeute: 99 mg (quantitativ umgesetzt), als farbloser Feststoff

Ansatz II nach **AAV 5a**

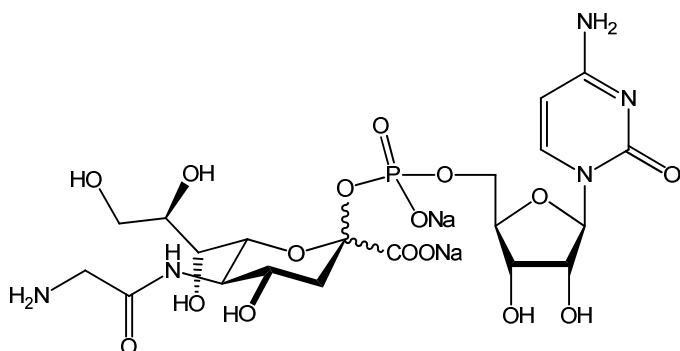
CMP-Neu5AcN₃: 30 mg (0.043 mmol)

Pd/CaCO₃: 3 mg

NH₄OH (20 mM): 1 mL

Ausbeute: 17 mg (59%), als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit n-Propanol/H₂O/NH₃ (6:2:1)

$R_f = 0.11$ (n-Propanol/H₂O/NH₃, 6:2:1)



2-Cytidin-5'-monophospho-*N*-(4-(1-(7-Hydroxy)-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butanoyl-D-neuraminsäure (217)

Ansatz I nach AAV 8

CMP-Neu5Hex (**210**): 50 mg (0.073 mmol, 1 Äq.) in 1 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

3-Azido-7-hydroxycumarin: 18 mg (0.087 mmol, 1.2 Äq.) in 1 mL ^tBuOH/H₂O (1:1)

CuSO₄·5H₂O: 36 mg (0.145 mmol, 2 Äq.) in 1 mL H₂O

Na-Vc: 14.4 mg (0.073 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H₂O

Ausbeute: 43 mg (64%), als gelbgrüner Feststoff als sauberes Produkt

Ansatz II nach AAV 10

OHCoum-Sia (**196**): 10 mg (0.017mmol, 1 Äq.)

CTP: 8.2 mg (0.017mmol, 1 Äq.)

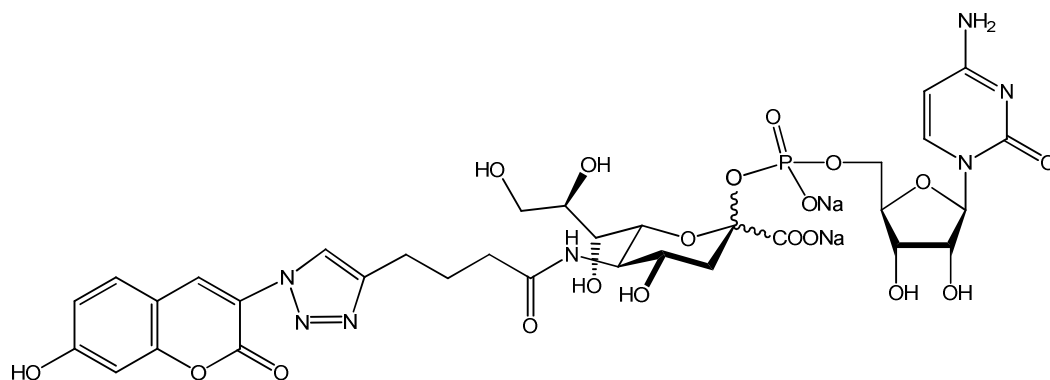
Anorganische Pyrophosphatase: 4 µL (2 U)

CSS: 5 mg

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 1.5 mL

Ausbeute: 17 mg (quantitativ umgesetzt), als gelbgrüner Feststoff

$R_f = 0.21$ (n-Propanol/H₂O/NH₃, 8:2:1)



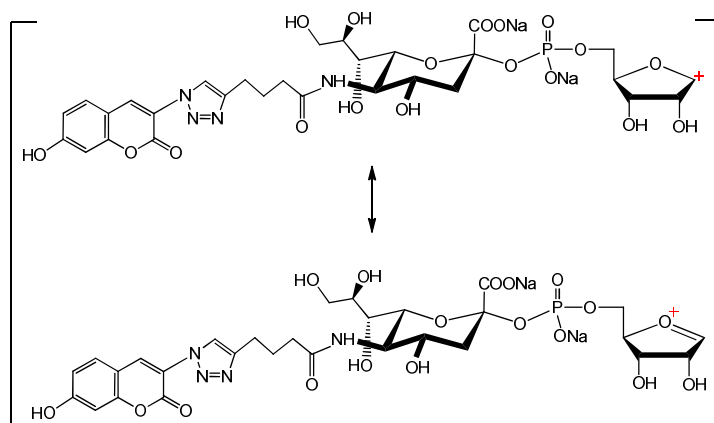
ESI-MS: C₃₃H₃₉N₇Na₂O₁₉P [M+H]⁺, berechnet 914.18, gemessen 914.3;

$C_{33}H_{39}N_7Na_3O_{19}P$ $[M+Na]^+$, berechnet 936.18, gemessen 936.2;

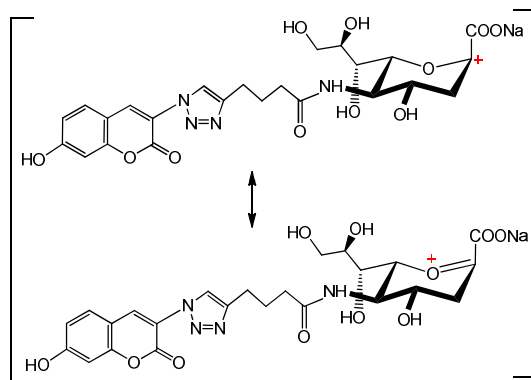
$C_{33}H_{39}N_7NaO_{19}P$ $[M-Na]^-$, berechnet 890.18, gemessen 890.1;

$C_{33}H_{40}N_7O_{19}P$ $[M-2Na+H]^+$, berechnet 868.18, gemessen 868.2;

Fragment 1: $[C_{29}H_{34}N_4Na_2O_{18}P]^+$, berechnet: 803.14, gemessen: 803.3



Fragment 2: $[C_{24}H_{26}N_4NaO_{11}]^+$, berechnet: 569.15, gemessen: 569.3



2-Cytidin-5'-monophospho-*N*-(4-(1-(7-diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butanoyl-D-neuraminsäure (218)

Ansatz I nach AAV 8

CMP-Neu5Hex (**210**): 15 mg (0.022 μ mmol, 1 Äq.) in 1 mL t BuOH/ H_2O (1:1)

NEt₂Coum-N₃ (**38**): 6.8 mg (0.026 mmol, 1.2 Äq.) in 1 mL t BuOH/ H_2O (1:1)

CuSO₄·5H₂O: 5.5 mg (0.022 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H₂O

Na-Vc: 4.36 mg (0.022 mmol, 1 Äq.) in 1 mL H₂O

Ausbeute: 14 mg (67%), als gelbgrüner Feststoff

Ansatz II nach AAV 10

Et₂NCoum-Sia (**197**): 20 mg (0.031 mmol, 1 Äq.)

CTP: 16.1 mg (0.031 mmol, 1 Äq.)

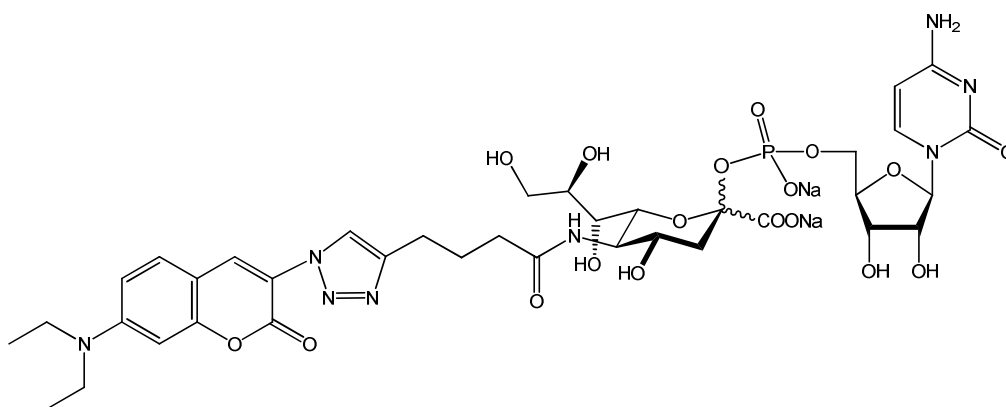
Anorganische Pyrophosphatase: 20 µL (10 U)

CSS: 10 mg

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 5 mL

Ausbeute: 32 mg (quantitativ umgesetzt), als gelbgrüner Feststoff

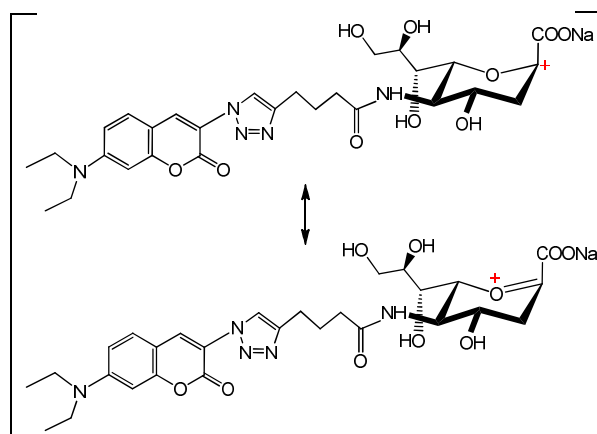
R_f = 0.21 (n-Propanol/H₂O/NH₃, 8:2:1)



ESI-MS: C₃₇H₄₈N₈Na₂O₁₈P [M+H]⁺, berechnet 969.25, gemessen 969.3;

C₃₇H₄₇N₈Na₃O₁₈P [M+Na]⁺, berechnet 991.24, gemessen 991.4;

Fragment 1: [C₂₈H₃₅N₅NaO₁₀]⁺, berechnet: 624.23, gemessen: 624.4



5-*O*–[((*N*-Acetyl- α -D-neuraminsäure-(2 \rightarrow 3))- β -D-lactosyloxy]-pentyl-10*H*-acridin-9-on
(Neu5Ac- α -2,3-Lac-P-Acr) (230)

5-*O*–[(*N*-Acetyl- α -D-neuraminsäure-(2 \rightarrow 8)-*N*-acetyl- α -D-neuraminsäure-(2 \rightarrow 3))- β -D-lactosyloxy]-pentyl-10*H*-acridin-9-on (Neu5Ac- α -2,8-Neu5Ac- α -2,3-Lac-P-Acr) (231)

Ein-Topf-Reaktion mit zwei Enzymen, CSS und α -2,3 SiaT

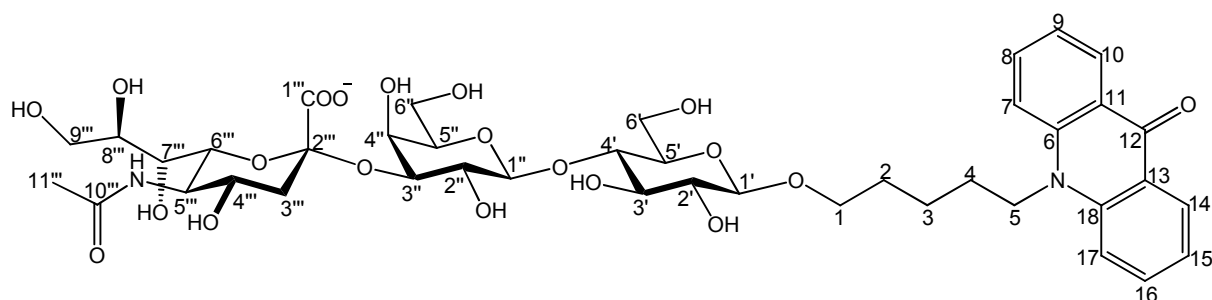
In 10.8 mL Pufferlösung (Tris: 50 mM, MgCl_2 : 50 mM, pH = 8.5) werden 100 mg (0.32 mmol, 1.05 Äq.) Neu5Ac, 183 mg (0.30 mmol, 1 Äq.) Lac-P-Acr (**105**) und 156 mg (0.32 mmol, 1.05 Äq.) CTP versetzt. Der pH-Wert wird auf 8.5 mit 1 N NaOH eingestellt. Anschließend werden 20 μL (25 U) anorganische Pyrophosphatase, CSS (120 mg) und 630 μL α -2,3 SiaT der Mischung zugegeben und bei 37 °C geschüttelt. Während der Reaktion wird der pH-Wert mittels pH-Papier ständig kontrolliert und auf 8.5 gehalten. Nach 24 h werden noch 3 äquivalente Neu5Ac, 3.5 äquivalente CTP, 8 mg CSS, 5 μL (6.2 U) anorganische Pyrophosphatase und 20 μL α -2,3 SiaT in der Reaktionsmischung zugegeben. Die Mischung wird weiter bei 37 °C über Nacht geschüttelt, bis DC-Kontrolle eine vollständige Umsetzung zeigt, und dann zentrifugiert. Der Überstand wird mit ca. 20 mL kalten EtOH versetzt, und bei 4 °C für 30 min aufbewahrt und zentrifugiert. Der Überstand wird im Vakuum eingedunstet und über BioGel-P2 und anschließend RP-C18-Kieselgel chromatographiert.

Ausbeute: 125 mg Neu5Ac- α -2,3-Lac-P-Acr (44%), als hellgelber Feststoff)

15 mg Neu5Ac- α -2,8-Neu5Ac- α -2,3-Lac-P-Acr (4%), als hellgelber Feststoff)

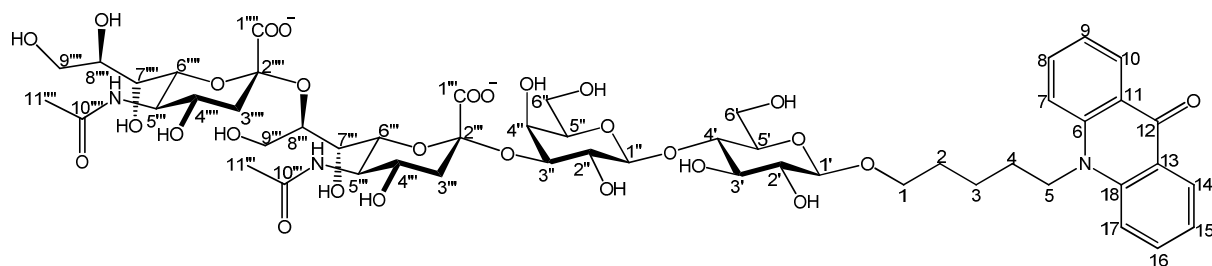
R_f = 0.51 (n-BuOH/Aceton/AcOH/ H_2O = 35:35:7:23) für Produkt **230**

$R_f = 0.41$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23) für Produkt **231**



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.76 (dd, J = 1.5, 8.0 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.34 – 7.30 (m, 2H, 8-, 16-H), 7.72 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 9-, 15-H), 4.42 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.21 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.01 (dd, J = 3.1, 9.9 Hz, 1H, 3'-H), 3.85 (d, J = 3.1 Hz, 1H, 4'-H), 3.81 – 3.79 (m, 4H, 6''', 6'a-, 9'''a-, 5'''-H), 3.68 – 3.59 (m, 6H, 6'b-, 6'-, 1a-, 8'''-, 4'''-H), 3.55 – 3.45 (m, 8H, 9'''b-, 3'-, 5-, 4'-, 5'''-, 7'''-, 2''-H), 3.38 – 3.35 (m, 2H, 1b-, 5'-H), 3.16 (t, J = 8.5 Hz, 1H, 2'-H), 2.65 (dd, J = 12.4, 4.6 Hz, 1H, 3'''a-H), 1.92 (s, 3H, 11'''-H), 1.70 (t, J = 12.2 Hz, 1H, 3'''b-H), 1.34 – 1.31 (m, 2H, 3-H), 1.13 – 1.08 (m, 4H, 2-, 4-H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 178.67 (C-12), 175.42 (C-1'''), 174.30 (C-10'''), 141.00 (C-6, -18), 134.96 (C-8, -16), 126.49 (C-10, -14), 122.05 (C-9, -15), 120.63 (C-13, -11), 115.52 (C-7, -17), 103.11 (C-1'), 102.49 (C-1'), 100.24 (C-2'''), 78.72 (C-4'), 75.93 (C-3'), 75.56 (C-8'''), 75.12 (C-5'), 74.86 (C-5'), 73.30 (C-3'), 73.22 (C-2'), 72.17 (C-6'''), 70.47 (C-1), 69.79 (C-2'), 68.77 (C-7'''), 68.52 (C-4'''), 67.91 (C-4'), 63.00 (C-9'''), 61.44 (C-6'), 60.52 (C-6'), 52.12 (C-5'''), 46.00 (C-5), 40.06 (C-3'''), 28.69 (C-4), 26.36 (C-2), 22.45 (C-3), 22.41 (C-11''') ppm.



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.89 (dd, J = 1.5, 8.1 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.46 (m, 2H, 8-, 16-H), 7.17 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.04 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 9-, 15-H), 4.38 (d, J = 7.8 Hz,

1H, 1'-H), 4.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1'-H), 4.04 – 3.98 (m, 2H, 9'''a-, 8'''-H), 3.95 (dd, $J = 3.1, 9.9$ Hz, 1H, 3''-H), 3.83 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, 4''-H), 3.80 (m, 1H, 6''''-H), 3.75 – 3.66 (m, 8H, 6'a-, 5-, 5''', 9'''a-, 1a-, 5''''-, 8''''-H), 3.62 – 3.58 (m, 5H, 6'b-, 9'''b-, 6''-, 5''-H), 3.55 – 3.40 (m, 10H, 6''', 4''', 9'''b-, 3'-, 4''''-, 4'-, 1b-, 2''-, 7''''-, 5'-H), 3.15 (dd, $J = 8.2, 9.0$ Hz 1H, 2'-H), 2.63 (dd, $J = 12.4, 4.7$ Hz, 1H, 3''''a-H), 2.52 (dd, $J = 12.3, 4.4$ Hz, 1H, 3'''a-H), 1.92 (s, 3H, 11''''-H), 1.88 (s, 3H, 11'''-H), 1.60 (m, 2H, 3'''b-, 3''''b-H), 1.43 – 1.39 (m, 2H, 2-H), 1.35 – 1.31 (m, 2H, 4-H), 1.25 -1.20 (m, 4H, 3-H) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 179.05$ (C-12), 175.39 (C-1'''), 173.94 (C-10'''), 173.74 (C-10''''), 141.31 (C-6, -18), 135.15 (C-8, -16), 126.59 (C-10, -14), 122.22 (C-9, -15), 120.80 (C-13, -11), 115.87 (C-7, -17), 103.11 (C-1'), 102.48 (C-1'), 100.91 (C-2''), 100.67 (C-2'''), 78.59 (C-8'''), 78.52 (C-4'), 75.85 (C-3'), 75.60 (C-8''''), 75.18 (C-5'), 74.78 (C-5'), 74.44 (C-6'''), 73.27 (C-3'), 73.06 (C-2'), 72.13 (C-6''''), 70.55 (C-1), 69.77 (C-2'), 69.71 (C-7'''), 68.86 (C-7''''), 68.56 (C-4'''), 68.37 (C-4'''), 67.95 (C-4'), 62.99 (C-9'''), 62.00 (C-9''), 61.50 (C-6'), 60.47 (C-6'), 52.68 (C-5'''), 52.17 (C-5''''), 46.12 (C-5), 40.93 (C-3'''), 40.02 (C-3''''), 28.79 (C-2), 26.53 (C-4), 22.72 (C-11'''), 22.53 (C-3), 22.43 (C-11''''') ppm.

ESI-MS: $\text{C}_{52}\text{H}_{72}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_{28}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet 1232.40, gemessen 1232.1;

$\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{Na}_3\text{O}_{28}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet 1254.40, gemessen 1254.4;

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-((*N*-Acetyl- α -D-neuraminsäure)-(2→3)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Neu5Ac- α -2,3-Lac-D-T-P-Acr) (232)

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-((*N*-Acetyl- α -D-neuraminsäure)-(2→8)-*N*-acetyl- α -D-neuraminsäure-(2→3)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy) methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Neu5Ac- α -2,8-Neu5Ac- α -2,3-Lac-D-T-P-Acr) (233)

Ansatz I nach AAV 13

Neu5Ac: 200 mg (0.64 mmol, 4 Äq.)

CTP: 309 mg (0.64 mmol, 4 Äq.)

CSS: 240 mg

anorganische Pyrophosphatase: 100 μ L (50 U)

Lac-D-T-P-Acr (**115**): 121 mg (0.16 mmol, 1 Äq.)

Alkalische Phosphatase: 60 μ L (50 U)

α -2,3-SiaT: 1.3 mL

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 15 mL

Ausbeute: 157 mg Produkt **232** (92% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr als hellgelber Feststoff)

13 mg Produkt **233** (6% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr als hellgelber Feststoff)

Ansatz II

Ein-Topf-Reaktion mit zwei Enzyme, CSS und α -2,3 SiaT

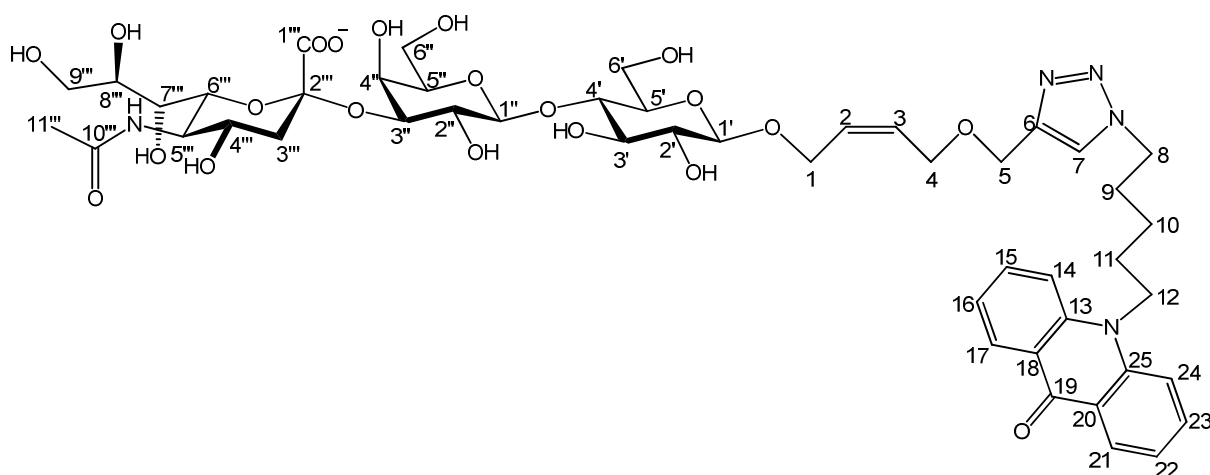
In 6 mL Pufferlösung (Tris: 50 mM, MgCl₂: 50 mM, pH = 8.5) werden 100 mg (0.32 mmol, 4 Äq.), 60.5 mg (0.08 mmol, 1 Äq.) Lac-D-T-P-Acr (**115**) und 155 mg (0.32 mmol, 4 Äq.) CTP versetzt. Der pH-Wert wird auf 8.5 mit 1 N NaOH eingestellt. Anschließend werden 20 μ L (25 U) anorganische Pyrophosphatase, CSS (120 mg) und 630 μ L α -2,3 SiaT in der Mischung zugegeben, und bei 37 °C geschüttelt. Während der Reaktion wird der pH-Wert mittels pH-Papier ständig kontrolliert und auf 8.5 gehalten. Nach 20 h werden noch 4 äquivalente Neu5Ac, 4 äquivalente CTP, 15 mg CSS, 5 μ L (6.2 U) anorganische Pyrophosphatase und 20 μ L α -2,3 SiaT in der Reaktionsmischung zugegeben. Nach 5 stündigem Rühren werden noch 2 äquivalente Neu5Ac, 2 äquivalente CTP, 8 mg CSS, 5 μ L (6.2 U) anorganische Pyrophosphatase und 10 μ L α -2,3 SiaT in der Reaktionsmischung zugegeben, und bei weiter bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Anschließend wird die Mischung zentrifugiert. Der Überstand wird mit ca. 20 mL kalten EtOH versetzt, und bei 4 °C für 30 min aufbewahrt und zentrifugiert. Der Überstand wird im Vakuum eingengt und durch BioGel-P2 und anschließend RP-C18-Kieselgel chromatographiert.

Ausbeute: 49 mg Neu5Ac- α -2,3-Lac-D-T-P-Acr (57%), als hellgelber Feststoff

35 mg Neu5Ac- α -2,8-Neu5Ac- α -2,3-Lac-D-T-P-Acr (32%), als hellgelber Feststoff

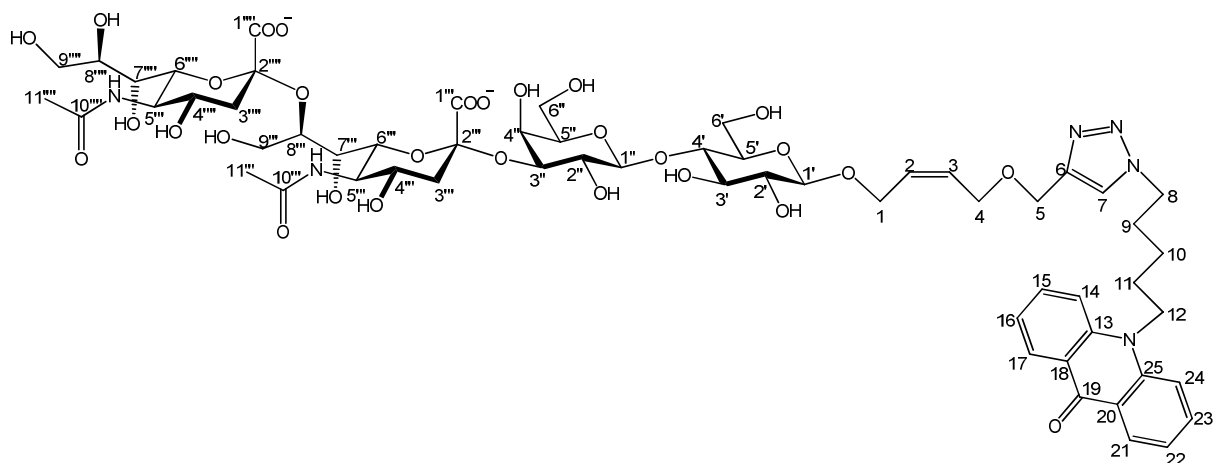
R_f = 0.66 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23) für Produkt **232**

$R_f = 0.47$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23) für Produkt **233**



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.69 (dd, J = 1.5, 8.0 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.63 (s, 1H, 7-H), 7.20 – 7.17 (m, 2H, 15-, 23-H), 6.78 – 6.74 (m, 4H, 24-, 14-, 16-, 22-H), 5.56 – 5.52 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.35 (s, 2H, 5-H), 4.32 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.15 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.11 – 4.06 (m, 3H, 1a-, 8-H), 3.99 (dd, 1H, 1b-H), 3.95 (dd, J = 3.1, 9.9 Hz, 1H, 3'-H), 3.83 (d, J = 6.0 Hz, 2H, 4-H), 3.81 (d, J = 3.1 Hz, 1H, 4'-H), 3.75 – 3.68 (m, 4H, 6''', 9'''a-, 6'a-, 5'''-H), 3.61 – 3.35 (m, 13H, 6'b-, 6''-, 8''-, 7''-, 9''b-, 3'-, 4''-, 4'-, 2''-, 8-, 5'-H), 3.24 – 3.21 (m, 1H, 5'-H), 3.10 (dd, J = 8.1, 9.1 Hz, 1H, 2'-H), 2.61 (dd, J = 12.5, 4.6 Hz, 1H, 3'''a-H), 1.88 (s, 3H, 11'''-H), 1.65 (t, J = 12.0 Hz, 1H, 3'''b-H), 1.47 – 1.41 (m, 2H, 9-H), 0.96 - 0.88 (m, 4H, 11-, 10-H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 178.38 (C-19), 175.39 (C-1'''), 174.28 (C-10'''), 144.15 (C-6), 140.89 (C-13, -25), 134.87 (C-15, -23), 129.60 (C-2), 129.35 (C-3), 126.54 (C-17, -21), 124.97 (C-7), 121.95 (C-16, -22), 120.68 (C-18, -20), 115.30 (C-14, -24), 103.09 (C-1'), 101.43 (C-1'), 100.18 (C-2'''), 78.65 (C-4'), 75.89 (C-3'), 75.50 (C-8'''), 75.10 (C-5'), 74.76 (C-5'), 73.27 (C-3'), 73.04 (C-2'), 72.12 (C-6'''), 69.72 (C-2'), 68.69 (C-7'''), 68.47 (C-4'''), 67.84 (C-4'), 65.44 (C-4), 65.03 (C-1), 62.96 (C-9'''), 62.66 (C-5), 61.38 (C-6'), 60.37 (C-6'), 52.11 (C-5'''), 50.38 (C-8), 45.56 (C-12), 40.02 (C-3'''), 29.14 (C-9), 26.06 (C-11), 22.95 (C-10), 22.42 (C-11''') ppm.



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 7.89 (dd, J = 1.5, 8.1 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.46 (m, 2H, 8-, 16-H), 7.17 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 7-, 17-H), 7.04 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 9-, 15-H), 4.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.25 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.04 – 3.98 (m, 2H, 9'''a-, 8'''-H), 3.95 (dd, J = 3.1, 9.9 Hz, 1H, 3'''-H), 3.83 (d, J = 3.2 Hz, 1H, 4'''-H), 3.80 (m, 1H, 6'''-H), 3.75 – 3.66 (m, 8H, 6'a-, 5-, 5'''-, 9'''a-, 1a-, 5'''-, 8'''-H), 3.62 – 3.58 (m, 5H, 6'b-, 9'''b-, 6'''-, 5'''-H), 3.55 – 3.40 (m, 10H, 6'''-, 4'''-, 9'''b-, 3'-, 4'''-, 4'-, 1b-, 2'''-, 7'''-, 5'-H), 3.15 (dd, J = 8.2, 9.0 Hz 1H, 2'-H), 2.63 (dd, J = 12.4, 4.7 Hz, 1H, 3'''a-H), 2.52 (dd, J = 12.3, 4.4 Hz, 1H, 3'''a-H), 1.92 (s, 3H, 11'''-H), 1.88 (s, 3H, 11'''-H), 1.60 (m, 2H, 3'''b-, 3'''b-H), 1.43 – 1.39 (m, 2H, 2-H), 1.35 – 1.31 (m, 2H, 4-H), 1.25 -1.20 (m, 4H, 3-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ = 179.05 (C-12), 175.36 (C-1''', -1'''), 173.94 (C-10'''), 173.73 (C-10'''), 144.13 (C-6), 141.04 (C-13, -25), 135.06 (C-15, -23), 129.53 (C-2), 129.38 (C-3), 126.57 (C-17, -21), 125.08 (C-7), 122.14 (C-16, -22), 120.70 (C-18, -20), 115.53 (C-14, -24), 103.09 (C-1'), 101.44 (C-1'), 100.86 (C-2'''), 100.64 (C-2'''), 78.59 (C-8'''), 78.40 (C-4'), 75.81 (C-3'), 75.53 (C-8'''), 75.12 (C-5'), 74.68 (C-5'), 74.45 (C-6'''), 73.07 (C-3', -2'), 72.10 (C-6'''), 69.76 (C-2'), 69.66 (C-7'''), 68.82 (C-7'''), 68.53 (C-4'''), 68.33 (C-4'''), 67.89 (C-4'), 65.26 (C-4), 65.01 (C-1), 62.95 (C-9'''), 62.59 (C-5), 61.99 (C-9'''), 61.45 (C-6'), 60.30 (C-6'), 52.66 (C-5'''), 52.16 (C-5'''), 50.50 (C-8), 45.54 (C-12), 40.92 (C-3'''), 40.00 (C-3'''), 29.09 (C-9), 26.15 (C-11), 22.98 (C-10), 22.70 (C-11'''), 22.41 (C-11''') ppm.

5-O-[[((N-Azidoacetyl- α -D-neuraminsäure-(2 \rightarrow 3))- β -D-lactosyloxy]-pentyl-10H acridin-9-on (Neu5AcN₃- α -2,3-Lac-P-Acr) (235)

Ansatz nach AAV 11

CMP-Neu5AcN₃ (**209**): 60 mg (0.086 mmol, 6 Äq.)

Lac-P-Acr (**105**): 8.5 mg (0.014 mmol, 1 Äq.)

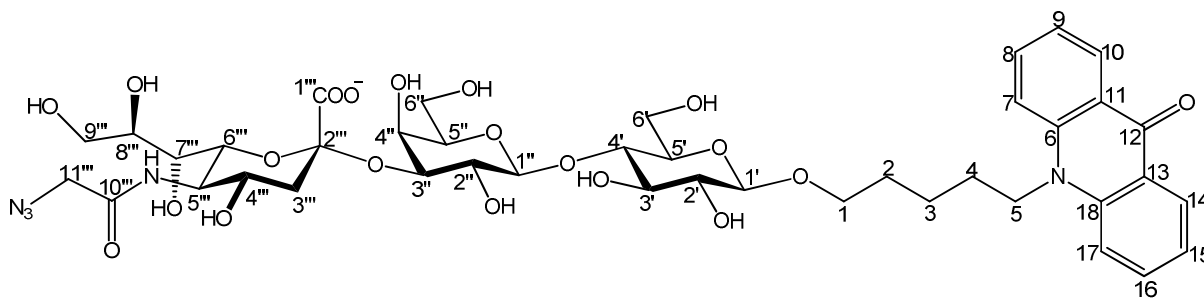
Alkalische Phosphatase (857 U/mL): 30 μ L

α -2,3-SiaT: 60 μ L

Puffer (Hepes: 20 mM; MgCl₂: 10 mM, pH = 7.5): 1 mL

Ausbeute: 13 mg (99% bezogen auf Lac-P-Acr), als hellgelber Feststoff

R_f = 0.48 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23)



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.77 (dd, J = 1.5, 7.9 Hz, 2H, 10-, 14-H), 7.36 – 7.32 (m, 2H, 8-, 16-H), 7.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 7-, 17-H), 6.93 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 9-, 15-H), 4.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.20 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 3.98 (dd, J = 3.1, 9.9 Hz, 1H, 3'-H), 3.94 (s, 2H, 11'''-H), 3.83 (d, J = 3.1 Hz, 1H, 4'-H), 3.79 - 3.71 (m, 4H, 5'''-, 6'''-, 6'a-, 9'''a-H), 3.64 – 3.45 (m, 14H, 1a-, 6''-, 6'b-, 8'''-, 4'''-, 9'''b-, 3'-, 5-, 4'-, 5'-, 7'''-, 2''-H), 3.39 – 3.32 (m, 2H, 1b-, 5'-H), 3.15 (t, J = 8.4 Hz, 1H, 2'-H), 2.64 (dd, J = 12.4, 4.6 Hz, 1H, 3'''a-H), 1.68 (t, J = 12.2 Hz, 1H, 3'''b-H), 1.34 – 1.31 (m, 2H, 2-H), 1.16 – 1.08 (m, 4H, 4-, 3-H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 178.27 (C-12), 173.76 (C-1'''), 171.03 (C-10'''), 140.58 (C-6, -18), 134.49 (C-8, -16), 126.00 (C-10, -14), 121.58 (C-9, -15), 120.16 (C-13, -11), 115.11 (C-7, -17), 102.57 (C-1'), 101.96 (C-1'), 99.72 (C-2'''), 78.20 (C-4'), 75.40 (C-3'), 75.04 (C-8'''), 74.60 (C-5'), 74.32 (C-5'), 72.69 (C-2'), 72.44 (C-3'), 71.71 (C-

6'''), 69.96 (C-1), 69.26 (C-2''), 68.08 (C-7'''), 67.93 (C-4'''), 67.36 (C-4'), 62.45 (C-9'''), 61.07 (C-6'), 60.00 (C-6'), 51.79 (C-11'''), 51.67 (C-5'''), 45.52 (C-5), 39.57 (C-3'''), 28.19 (C-2), 25.88 (C-4), 21.91 (C-3) ppm.

***N*-(2-(4-(3-(4-(3,6-(diethyliminio)-3*H*-xanthen-9-yl)-3-sulfonatophenyl)sulfonamido)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))acetyl- α -D-neuraminsäure-(2 \rightarrow 3)- β -D-lactosyloxy-pentyl-10*H*-acridin-9-on (Roh-L-T-Neu5Ac- α -2,3-Lac-P-Acr) (236)**

Ansatz nach AAV 8

Neu5AcN₃- α -2,3-Lac-P-Acr (**235**): 16 mg (0.017 mmol, 1.7 Äq.) in 500 μ L ^tBuOH/H₂O = 1:1

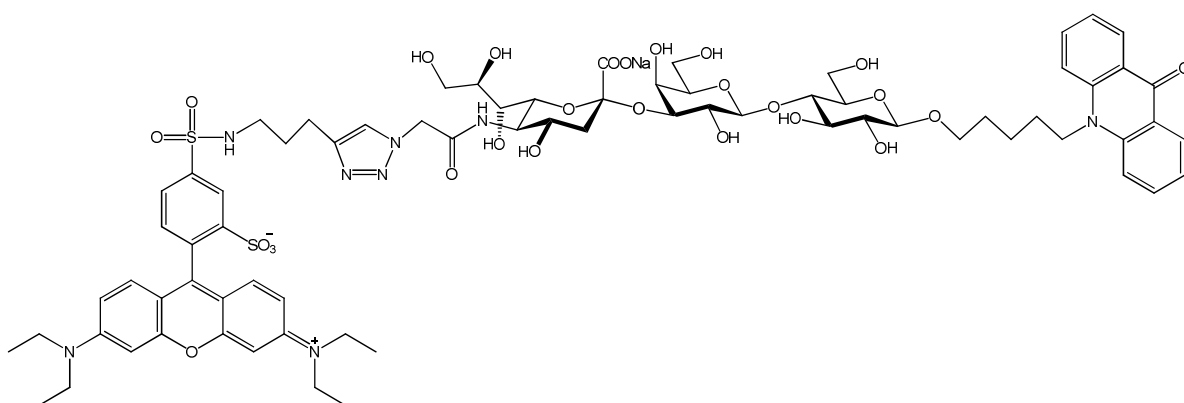
Rho-Pentin (**6**): 6 mg (0.010 mmol, 1 Äq.) in 500 μ L ^tBuOH/H₂O = 1:1

CuSO₄·5H₂O: 5 mg (0.020 mmol, 2 Äq.) in 500 μ L H₂O

Na-Vc: 3 mg (0.015 mmol, 1.5 Äq.) in 500 μ L H₂O

Ausbeute: 10.5 mg (69%), als roter Feststoff nach der säulenchromatographischer Aufreinigung über RP-C18-Kieselgel

R_f = 0.29 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23)



ESI-MS: C₇₃H₉₁N₈Na₂O₂₆S₂ [M+Na]⁺, berechnet 1605.53, gemessen 1605.5;

C₇₃H₉₀N₈Na₃O₂₆S₂ [M+2Na-H]⁺, berechnet 1627.53, gemessen 1627.4;

C₇₃H₉₀N₈Na₁O₂₆S₂ [M-H]⁻, berechnet 1581.54, gemessen 1581.5;

$C_{73}H_{91}N_8Na_1O_{26}S_2$ [M-Na]⁻, berechnet 1559.55, gemessen 1559.5;

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-((*N*-Azidoacetyl- α -D-neuraminsäure)-(2→3)- β -D-lacto-syloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Neu5AcN₃- α -2,3-Lac-D-T-P-Acr) (237)

Ansatz nach AAV 11

CMP-Neu5AcN₃ (**209**): 74 mg (0.106 mmol, 4 Äq.)

Lac-D-T-P-Acr (**115**): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

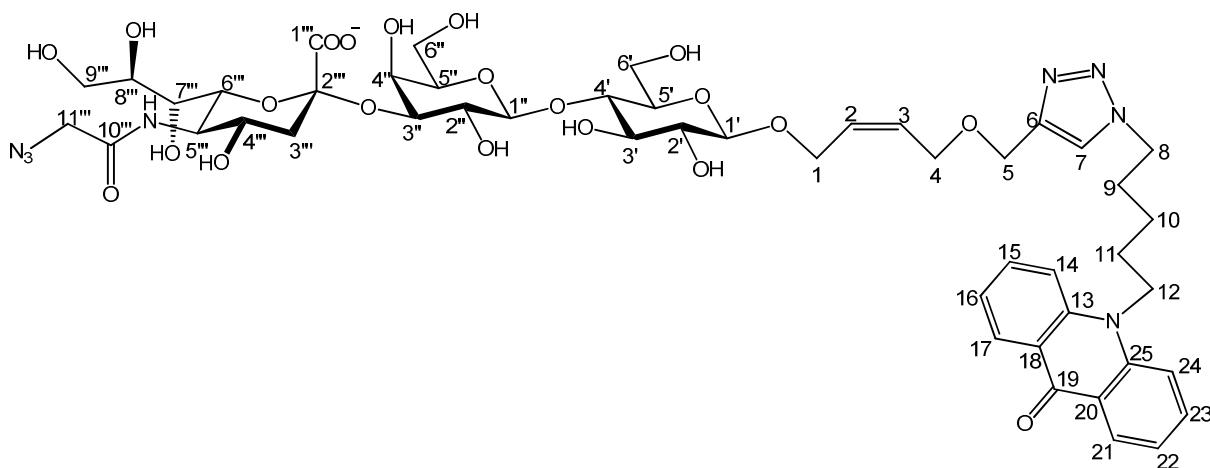
Alkalische Phosphatase (857 U/mL): 30 μ L

α -2,3-SiaT: 50 μ L

Puffer (Hepes: 20 mM; MgCl₂: 10 mM, pH = 7.5): 1.5 mL

Ausbeute: 17 mg (59% bezogen auf Lac-P-Acr), als hellgelber Feststoff

$R_f = 0.38$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23)



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.83 (d, J = 7.9 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.74 (s, 1H, 7-H), 7.42 – 7.30 (m, 2H, 15-, 23-H), 7.02 – 6.85 (m, 4H, 24-, 14-, 16-, 22-H), 5.71 – 5.56 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.46 (s, 2H, 5-H), 4.41 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1''-H), 4.24 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.22 – 4.14 (m, 3H, 8-, 1a-H), 4.11 – 4.06 (m, 1H, 1b-H), 4.04 (dd, J = 9.9, 3.1 Hz, 1H, 3''-H), 4.01 (d, J = 0.9 Hz, 2H, 11'''-H), 3.94 - 3.88 (m, 3H, 4-, 4''-H), 3.87 – 3.77 (m, 4H, 5'''-,

6''', 9'''a-, 6'a-H), 3.73 – 3.66 (m, 5H, 4'''-, 6'b-, 8'''-, 6'-H), 3.65 – 3.43 (m, 9H, 5'''-, 9'''b-, 12-, 7'''-, 4'-, 2'''-, 3'-H), 3.31 (ddd, $J = 9.7, 4.8, 2.5$ Hz, 1H, 5'-H), 3.18 (dd, $J = 8.1, 9.1$ Hz, 1H, 2'-H), 2.72 (dd, $J = 12.5, 4.6$ Hz, 1H, 3'''a-H), 1.75 (t, $J = 12.0$ Hz, 1H, 3'''b-H), 1.64 – 1.53 (m, 2H, 9-H), 1.16 – 1.06 (m, 2H, 11-H), 1.05 – 0.94 (m, 2H, 10-H) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 178.18$ (C-19), 173.88 (C-1'''), 171.15 (C-10'''), 143.80 (C-6), 140.63 (C-13, -25), 134.60 (C-15, -23), 129.22 (C-2), 129.00 (C-3), 126.20 (C-17, -21), 124.67 (C-7), 121.68 (C-16, -22), 120.35 (C-18, -20), 115.06 (C-14, -24), 102.73 (C-1'), 101.02 (C-1'), 99.82 (C-2'''), 78.29 (C-4'), 75.54 (C-3'), 75.14 (C-5'), 74.73 (C-5'), 74.39 (C-3'), 72.67 (C-2'), 72.59 (C-8'''), 71.83 (C-6'''), 69.35 (C-2'''), 68.18 (C-7'''), 68.07 (C-4'''), 67.45 (C-4'), 64.99 (C-4), 64.63 (C-1), 62.60 (C-9'''), 62.27 (C-5), 61.01 (C-6'), 60.01 (C-6'), 51.90 (C-11'''), 51.83 (C-5'''), 50.08 (C-8), 45.20 (C-12), 39.73 (C-3'''), 28.75 (C-9), 25.74 (C-11), 22.61 (C-10) ppm.

10-[5-(4-(((Z)-4-O-((N-(Hex-5-ynoyl)- α -D-neuraminsäure)-(2 \rightarrow 3)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Neu5Hex- α -2,3-Lac-D-T-P-Acr) (238)

Ansatz nach AAV 11

CMP-Neu5Hex (**210**): 100 mg (0.145 mmol, 5.6 Äq.)

Lac-D-T-P-Acr (**115**): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

Alkalische Phosphatase (857 U/mL): 30 μL

α -2,3-SiaT: 60 μL

Puffer (Hepes: 20 mM; MgCl_2 : 10 mM, pH = 7.5): 1.8 mL

Ausbeute: 20 mg (69% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

$R_f = 0.49$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/ $\text{H}_2\text{O} = 35:35:7:23$)

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-((*N*-Aminoacetyl- α -D-neuraminsäure)-(2 \rightarrow 3)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Neu5Ac-NH₂- α -2,3-Lac-D-T-P-Acr) (239)

Ansatz nach AAV 13

Neu5Ac-NH₂ (185): 73 mg (0.21 mmol, 4 Äq.)

CTP: 101 mg (0.21 mmol, 4 Äq.)

CSS: 50 mg

anorganische Pyrophosphatase: 20 μ L (25 U)

Lac-D-T-P-Acr (115): 40 mg (0.053 mmol, 1 Äq.)

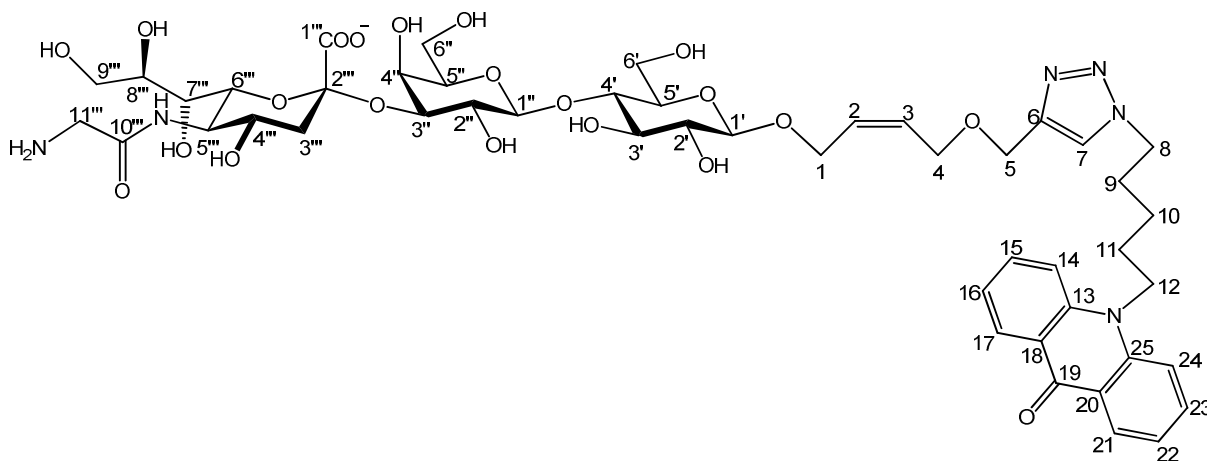
Alkalische Phosphatase: 15 μ L (25 U)

α -2,3-SiaT: 300 μ L

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 6 mL

Ausbeute: 28 mg (50% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

R_f = 0.10 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 40:40:5:15)



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.74 (dd, J = 1.5, 8.0 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.64 (s, 1H, 7-H), 7.27 – 7.22 (m, 2H, 15-, 23-H), 6.84 – 6.79 (m, 4H, 24-, 14-, 16-, 22-H), 5.56 – 5.51 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.36 (s, 2H, 5-H), 4.32 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'''-H), 4.09 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.08 – 4.06 (m, 3H, 8-, 1a-H), 4.00 (dd, 1H, 1b-H), 3.95 (dd, J = 3.1, 9.9 Hz, 1H, 3'''-H), 3.83 - 3.81 (m, 3H, 4-, 4'''-H), 3.75 – 3.70 (m, 4H, 6''''-, 9''''-a-, 6'a-, 5''''-H), 3.59 – 3.39

(m, 13H, 6'-b-, 4''', 6'', 5'', 8''', 9'''b-, 12-, 7''', 4', 2'', 3'-H), 3.25 – 3.20 (m, 3H, 11''', 5'-H), 3.09 (dd, $J = 8.1, 9.1$ Hz, 1H, 2'-H), 2.62 (dd, $J = 12.5, 4.6$ Hz, 1H, 3'''a-H), 1.65 (t, $J = 12.0$ Hz, 1H, 3'''b-H), 1.48 – 1.45 (m, 2H, 9-H), 1.03 – 0.98 (m, 2H, 11-H), 0.93 - 0.86 (m, 2H, 10-H) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 177.51$ (C-19), 175.06 (C-1'''), 173.28 (C-10'''), 143.19 (C-6), 139.98 (C-13, -25), 133.95 (C-15, -23), 128.61 (C-2), 128.39 (C-3), 125.58 (C-17, -21), 124.02 (C-7), 121.04 (C-16, -22), 119.73 (C-18, -20), 114.40 (C-14, -24), 102.12 (C-1'), 100.44 (C-1'), 99.20 (C-2'''), 77.70 (C-4'), 74.92 (C-3'), 74.52 (C-5'), 74.12 (C-3'), 73.77 (C-2'), 72.18 (C-5'), 72.06 (C-8'''), 71.12 (C-6'''), 68.74 (C-2'), 67.65 (C-7'''), 67.43 (C-4'''), 66.84 (C-4'), 64.41 (C-4), 64.04 (C-1), 61.94 (C-9'''), 61.66 (C-5), 60.39 (C-6'), 59.40 (C-6'), 51.04 (C-5'''), 49.43 (C-8), 44.58 (C-12), 42.96 (C-11'''), 39.09 (C-3'''), 28.14 (C-9), 25.11 (C-11), 21.98 (C-10) ppm.

***N*-(2-(3-(3-Carboxylato-4-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)phenyl)thioureido) acetyl- α -D-neuraminsäure-(2 \rightarrow 3)- β -D-lactosyloxy-pentyl-10*H*-acridin-9-on (FITC-Neu5Ac- α -2,3-Lac-D-T-P-Acr) (240)**

Synthese vom Produkt in einer Kaskade

Zuerst synthese von Neu5Ac-NH₂- α -2,3-Lac-D-T-P-Acr (**239**):

Ansatz nach AAV 13

Neu5AcNH₂ (**185**): 146 mg (0.423 mmol, 4 Äq.)

CTP: 204 mg (0.423 mmol, 4 Äq.)

CSS: 90 mg

anorganische Pyrophosphatase: 30 μL (37 U)

Lac-D-T-P-Acr (**115**): 80 mg (0.106 mmol, 1 Äq.)

Alkalische Phosphatase: 24 μL (40 U)

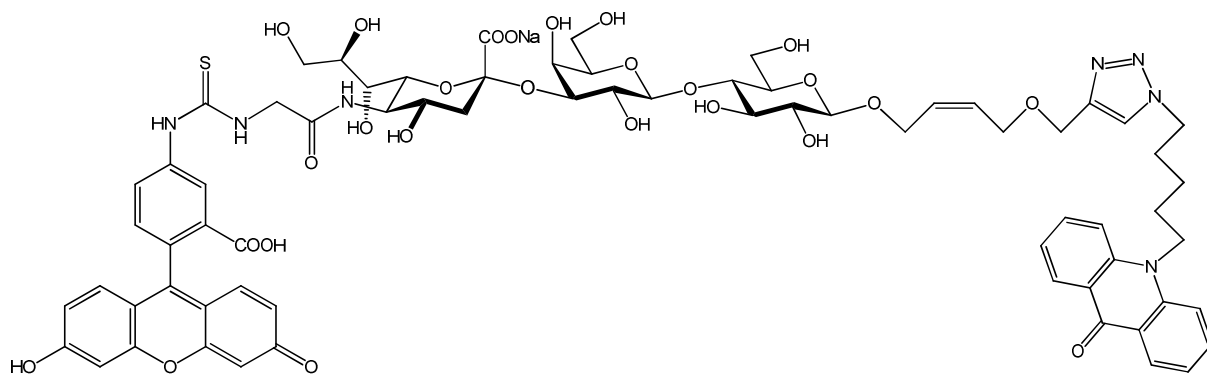
α -2,3-SiaT: 500 μL

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl_2 , pH = 8.5): 14 mL

Die Reaktion wird nach **AAV 13** durchgeführt. Wenn die DC-Kontrolle eine fast vollständige Umsetzung zeigt, werden 45 mg (0.115 mmol, 1.1 Äq.) FITC in der Reaktionsmischung zugegeben. Der pH-Wert wird auf 9 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird bei RT unter Dunkelheit über Nacht geschüttelt. Anschließend wird die Mischung zentrifugiert, und der Überstand wird lyophilisiert. Der Rückstand wird über BioGel-P2 chromatographiert. Die Fraktionen werden gesammelt, im Vakuum eingengt und lyophilisiert.

Ausbeute: 74 mg (47% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als oranger Feststoff

$R_f = 0.36$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 40:40:5:15)



ESI-MS: C₆₉H₇₇N₇Na₁O₂₆S [M+H]⁺, berechnet 1474.45, gemessen 1474.7;

C₆₉H₇₇N₇O₂₆S [M-Na]⁻, berechnet 1450.46, gemessen 1450.7;

C₆₉H₇₅N₇Na₁O₂₆S [M-H]⁻, berechnet 1472.45, gemessen 1472.6;

10-[5-(4-(((Z)-4-O-((9-Azido-*N*-acetyl- α -D-neuraminsäure)-(2→6)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Neu5Ac9N₃- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (241)

Ansatz nach **AAV 13**

Neu5Ac-9N₃ (**162**): 35 mg (0.104 mmol, 4 Äq.)

CTP: 60 mg (0.125 mmol, 4.8 Äq.)

CSS: 15 mg

anorganische Pyrophosphatase: 10 μ L (12 U)

Lac-D-T-P-Acr (**115**): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

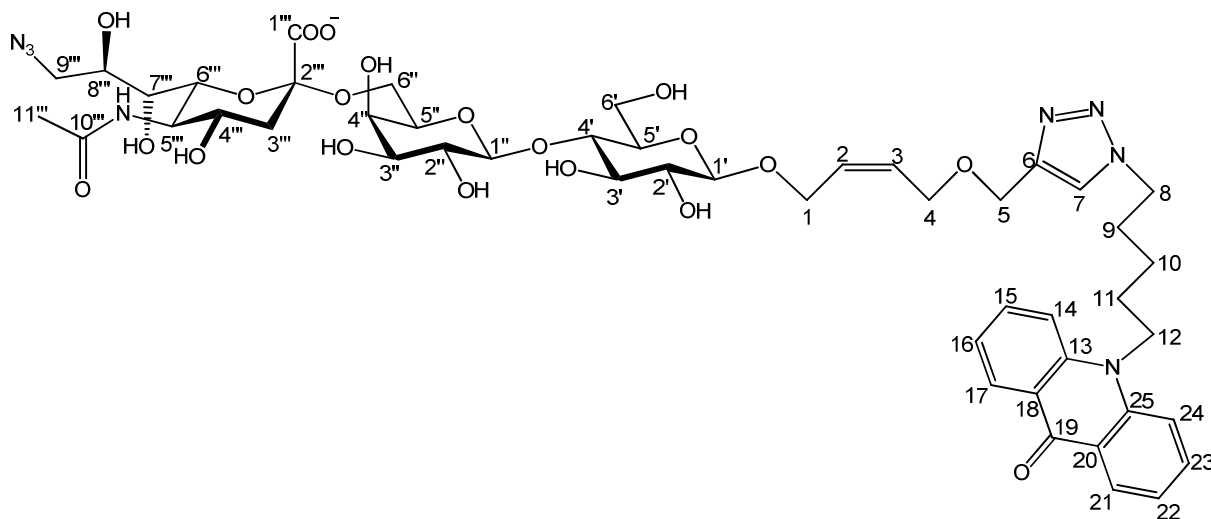
Alkalische Phosphatase: 6 μ L (10 U)

α -2,6-SiaT: 50 μ L

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl_2 , pH = 8.5): 3 mL

Ausbeute: 23 mg (83% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

R_f = 0.21 (n-BuOH/Aceton/AcOH/ H_2O , 40:40:5:15)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 7.83 (d, J = 7.6 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.74 (s, 1H, 7-H), 7.33 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 15-, 23-H), 7.07 – 6.79 (m, 4H, 14-, 24-, 16-, 22-H), 5.78 – 5.44 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.46 (s, 2H, 5-H), 4.31 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.26 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.22 – 4.14 (m, 3H, 8-, 1a-H), 4.14 – 4.06 (m, 1H, 1b-H), 3.99 – 3.84 (m, 5H, 6'''-, 4-, 6'a-, 8'''-H), 3.83 – 3.76 (m, 2H, 5'''-, 6'a-H), 3.76 – 3.65 (m, 3H, 5''-, 4''-, 6'b-H), 3.63 – 3.44 (m, 11H, 4'''-, 3''-, 9'''a-, 12-, 6'b-, 7'''-, 2''-, 3'-, 4'-H), 3.41 (dd, J = 13.3, 6.2 Hz, 1H, 9'''b-H), 3.38 – 3.31 (m, 1H, 5'-H), 3.27 – 3.16 (m, 1H, 2'-H), 2.65 (dd, J = 12.2, 4.4 Hz, 1H, 3'''a-H), 1.97 (s, 3H, 11'''-H), 1.67 (td, J = 12.2, 3.9 Hz, 1H, 3'''b-H), 1.62 – 1.47 (m, 2H, 9-H), 1.17 – 1.04 (m, 2H, 11-H), 1.03 – 0.88 (m, 2H, 10-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 178.12 (C-19), 174.86 (C-1'''), 173.45 (C-10'''), 143.71 (C-6), 140.61 (C-13, -25), 134.56 (C-15, -23), 129.25 (C-2), 129.00 (C-3), 126.21 (C-17, -21), 124.64 (C-7), 121.64 (C-16, -22), 120.37 (C-18, -20), 115.02 (C-14, -24), 103.25 (C-1'),

100.92 (C-1'), 100.35 (C-2'''), 79.58 (C-4'), 74.66 (C-3'), 74.64 (C-5'), 73.70 (C-5''), 72.62 (C-2'), 72.41 (C-4''), 72.34 (C-3''), 72.06 (C-2''), 70.78, 70.37 (C-6'''), 69.09 (C-7'''), 68.49 (C-8'''), 68.32 (C-4'''), 65.06 (C-4), 64.61 (C-1), 62.50 (C-6''), 62.29 (C-5), 59.35 (C-6'), 53.17 (C-9'''), 51.83 (C-5'''), 50.04 (C-8), 45.20 (C-12), 40.18 (C-3'''), 28.79 (C-9), 25.76 (C-11), 22.62 (C-10), 22.10 (C-11''') ppm.

10-[5-(4-(((Z)-4-O-((N-Acetyl-5-amino-3,5-didesoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosäure)- α (2 \rightarrow 6)- β -D-lacto-syloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10H-acridin-9-on (C8-Neu5Ac- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (242)

Ansatz nach AAV 13

C8-Neu5Ac (**163**): 44 mg (0.156 mmol, 6 Äq.)

CTP: 90 mg (0.187 mmol, 7.2 Äq.)

CSS: 20 mg

anorganische Pyrophosphatase: 10 μ L (12 U)

Lac-D-T-P-Acr (**115**): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

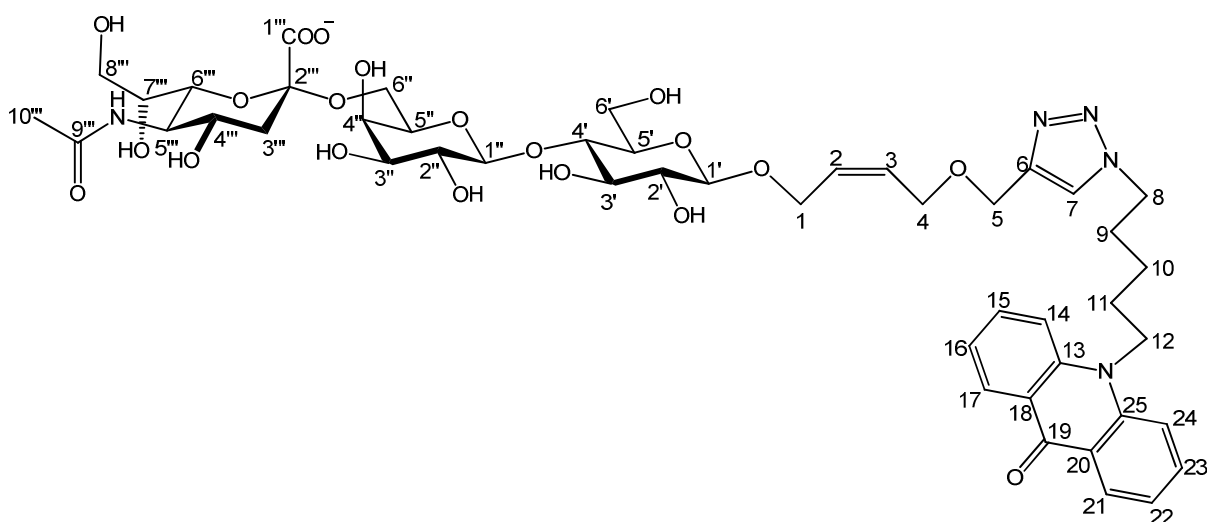
Alkalische Phosphatase: 6 μ L (10 U)

α -2,6-SiaT: 60 μ L

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 3 mL

Ausbeute: 20 mg (74% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

R_f = 0.21 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O, 40:40:5:15)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 7.95 (d, J = 7.4 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.74 (s, 1H, 7-H), 7.50 (s, 2H, 15-, 23-H), 7.16 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 14-, 24-H), 7.06 (t, J = 6.4 Hz, 2H, 16-, 22-H), 5.60 (tdd, J = 17.5, 11.4, 6.4 Hz, 2H, 2-, 3-H), 4.44 (s, 2H, 5-H), 4.32 – 4.23 (m, 3H, 1' '-, 8-H), 4.21 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1' -H), 4.12 (dd, J = 12.6, 5.9 Hz, 1H, 1a-H), 4.01 (dd, J = 12.9, 6.7 Hz, 1H, 1b-H), 3.84 (m, 4H, 4-, 4' '-, 8' ''a-H), 3.77 (m, 5H, 12-, 5' ''', 6' 'a-H), 3.72 – 3.66 (m, 1H, 5' '-H), 3.66 – 3.59 (m, 4H, 6' 'a-, 6' 'b-, 6' ''', 7' ''-H), 3.59 – 3.51 (m, 3H, 4' ''', 6' 'b-, 3' ''-H), 3.51 – 3.39 (m, 4H, 8' ''b-, 3' -, 4' -, 2' '-H), 3.36 – 3.28 (m, 1H, 5' -H), 3.17 (t, J = 8.5 Hz, 1H, 2' -H), 2.56 (dd, J = 12.2, 4.5 Hz, 1H, 3' ''a-H), 1.94 (s, 3H, 10' ''-H), 1.73 – 1.64 (m, 2H, 9-H), 1.60 (t, J = 12.2 Hz, 1H, 3' ''b-H), 1.26 (m, 2H, 11-H), 1.14 – 1.03 (m, 2H, 10-H)ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 178.93 (C-19), 175.30 (C-1' '''), 173.87 (C-9' '''), 141.27 (C-13, -25), 135.18 (C-15, -23), 129.51 (C-2), 129.40 (C-3), 126.66 (C-17, -21), 125.14 (C-7), 122.26 (C-16, -22), 120.82 (C-18, -20), 115.78 (C-14, -24), 103.59 (C-1' '), 101.25 (C-1'), 100.87 (C-2' '''), 79.83 (C-4'), 75.00 (C-3' ', -5'), 74.06 (C-5' '), 73.46 (C-7' '''), 72.97 (C-2'), 72.75 (C-3' '), 71.15 (C-2' '), 69.48 (C-6' '''), 68.87 (C-4' '), 68.47 (C-4' '''), 65.17 (C-4), 64.94 (C-1), 63.18 (C-8' '''), 62.85 (C-6' '), 62.56 (C-5), 60.55 (C-6'), 52.33 (C-5' '''), 50.55 (C-8), 45.61 (C-12), 40.54 (C-3' '''), 29.10 (C-9), 26.25 (C-11), 23.03 (C-10), 22.44 (C-10' ''')ppm.

ESI-MS: $\text{C}_{47}\text{H}_{62}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{20}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet 1062.4, gemessen 1062.8;

$\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{N}_5\text{Na}_3\text{O}_{20}$ $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$, berechnet 1084.4, gemessen 1084.7;

$\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{N}_5\text{NaO}_{20}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, berechnet 1038.38, gemessen 1038.6;

$\text{C}_{47}\text{H}_{62}\text{N}_5\text{O}_{20}$ $[\text{M}-\text{Na}]^-$, berechnet 1016.41, gemessen 1016.8

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*–((*N*-Acetyl-5-amino-3,5-dideoxy- α -L-*arabino*-2-heptulopyranosäure)-(2 \rightarrow 6)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (C7-Neu5Ac- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (243)

Ansatz nach AAV 13

C7-Neu5Ac (**168**): 39 mg (0.156 mmol, 6 Äq.)

CTP: 90 mg (0.187 mmol, 7.2 Äq.)

CSS: 20 mg

anorganische Pyrophosphatase: 10 μ L (12 U)

Lac-D-T-P-Acr (**115**): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

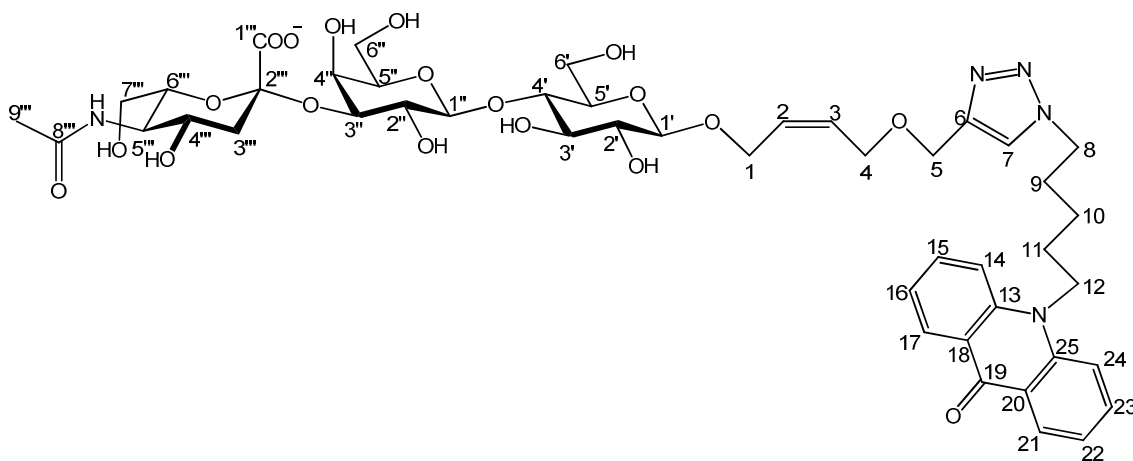
Alkalische Phosphatase: 6 μ L (10 U)

α -2,6-SiaT: 60 μ L

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 3 mL

Ausbeute: 20 mg (76% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

R_f = 0.51 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 40:40:5:15)



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.81 (d, J = 6.9 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.72 (s, 1H, 7-H), 7.35 (t, J = 7.2 Hz, 2H, 15-, 23-H), 7.03 – 6.86 (m, 4H, 24-, 14-, 16-, 22-H), 5.71 – 5.51 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.43 (s, 2H, 5-H), 4.28 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.21 – 4.11 (m, 3H, 8-, 1a-H), 4.05 (dd, J = 12.5, 6.8 Hz, 1H, 1b-H), 3.91 – 3.82 (m, 4H, 4, 7'''-a-, 4''-H), 3.77 (dd, J = 12.2, 2.1 Hz, 1H, 6'-a-H), 3.71 – 3.60 (m, 7H, 3''-, 6''-a-, 5''-, 5''',

6'-b-H), 3.52 (m, 6H, 6'''-, 12-, 4'''-, 6''b-, 7'''b-H), 3.47 – 3.40 (m, 3H, 3'-, 4'-, 2''-H), 3.32 (ddd, $J = 9.6, 5.2, 2.3$ Hz, 1H, 5'-H), 3.17 (dd, $J = 9.2, 8.1$ Hz, 1H, 2'-H), 2.56 (dd, $J = 12.3, 4.4$ Hz, 1H, 3'''a-H), 1.92 (s, 3H, 9'''-H), 1.58 (m, 3H, 3'''b-, 9-H), 1.16 – 1.04 (m, 2H, 11-H), 1.04 – 0.94 (m, 2H, 10-H) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 178.19$ (C-19), 174.69 (C-1'''), 173.55 (C-8'''), 143.73 (C-6), 140.60 (C-13, -25), 134.60 (C-15, -23), 129.16 (C-2), 128.97 (C-3), 126.16 (C-17, -21), 124.67 (C-7), 121.69 (C-16, -22), 120.29 (C-18, -20), 115.08 (C-14, -24), 103.23 (C-1'), 100.87 (C-1'), 100.63 (C-2'''), 79.54 (C-4'), 74.67 (C-5'), 74.64 (C-5'), 74.60 (C-3'), 73.67 (C-3'), 72.54 (C-2'), 72.36 (C-6'''), 70.79 (C-2'), 68.44 (C-4'), 67.74 (C-4'''), 64.92 (C-4), 64.57 (C-1), 63.32 (C-7'''), 62.21 (C-5), 61.10 (C-6'), 60.19 (C-6'), 51.96 (C-5'''), 50.07 (C-8), 45.17 (C-12), 40.18 (C-3'''), 28.71 (C-9), 25.72 (C-11), 22.56 (C-10), 22.06 (C-9''') ppm.

ESI-MS: $\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{N}_5\text{O}_{19}$ $[\text{M}-\text{Na}]^-$, berechnet 986.4, gemessen 986.3;

$\text{C}_{46}\text{H}_{59}\text{N}_5\text{Na}_1\text{O}_{19}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, berechnet 1008.37, gemessen 1008.2;

10-[5-(4-(((Z)-4-O-((3-Desoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-2-nonulopyranulosäure)-(2→6)-β-D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (KDN-α-2,6-Lac-D-T-P-Acr) (244)

Ansatz nach AAV 13

KDN (169): 45 mg (0.156 mmol, 6 Äq.)

CTP: 90 mg (0.187 mmol, 7.2 Äq.)

CSS: 50 mg

anorganische Pyrophosphatase: 10 μL (12 U)

Lac-D-T-P-Acr (115): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

Alkalische Phosphatase: 15 μL

α-2,6-SiaT: 60 μL

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl_2 , pH = 8.5): 3 mL

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-((3-Desoxy- α -D-*glycero*-D-*gulo*-2-nonulopyranosonsäure-(2 \rightarrow 6)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (epi-KDN- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (245)

Ansatz nach AAV 13

epi-KDN (170): 57 mg (0.198 mmol, 6 Äq.)

CTP: 115 mg (0.238 mmol, 7.2 Äq.)

CSS: 70 mg

anorganische Pyrophosphatase: 10 μ L (12 U)

Lac-D-T-P-Acr (115): 25 mg (0.033 mmol, 1 Äq.)

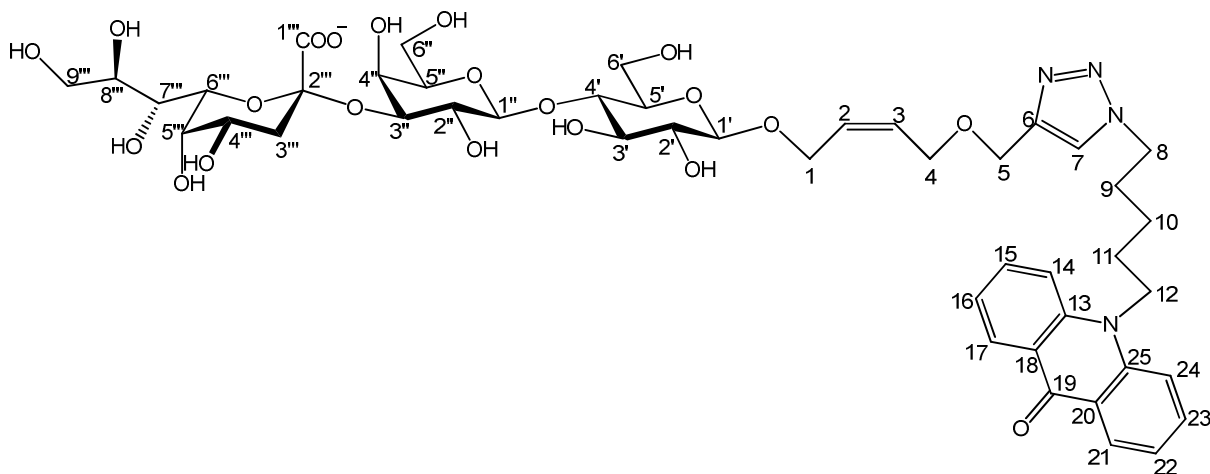
Alkalische Phosphatase: 15 μ L

α -2,6-SiaT: 60 μ L

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 3 mL

Ausbeute: 28 mg (82% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

R_f = 0.30 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 40:40:5:15)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.13 (dd, J = 8.1, 1.5 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.90 (s, 1H, 7-H), 7.66 (ddd, J = 8.6, 7.0, 1.5 Hz, 2H, 15-, 23-H), 7.35 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 24-, 14-H), 7.21 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 16-, 22-H), 5.82 – 5.63 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.56 (s, 2H, 5-H), 4.41 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.38 (m, 3H, 8-, 1'-H), 4.29 (dd, J = 12.8, 5.8 Hz, 1H, 1a-H), 4.19 (dd, J = 12.8,

7.1 Hz, 1H, 1b-H), 4.05 (dd, $J = 10.2, 8.5$ Hz, 1H, 9''a-H), 4.02 – 3.92 (m, 6H, 12-, 4-, 9''b-, 6'a-H), 3.90 – 3.73 (m, 6H, 5'''-, 6'''-, 4''-, 5''-, 4'''-, 6'b-), 3.68 – 3.53 (m, 8H, 6''-, 3''-, 8'''-, 4'-, 7'''-, 2''-, 3'-H), 3.46 (ddd, $J = 9.6, 4.9, 2.4$ Hz, 1H, 5'-H), 3.29 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H, 2'-H), 2.44 (dd, $J = 12.2, 4.6$ Hz, 1H, 3''a-H), 1.92 (t, $J = 12.4$ Hz, 1H, 3''b-H), 1.85 – 1.76 (m, 2H, 9-H), 1.50 – 1.39 (m, 2H, 11-H), 1.27 – 1.17 (m, 2H, 10-H).

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 174.45$ (C-19), 173.87 (C-1'''), 143.95 (C-6), 141.20 (C-13, -25), 135.02 (C-15, -23), 129.31 (C-2), 129.16 (C-3), 126.51 (C-17, -21), 124.91 (C-7), 122.05 (C-16, -22), 120.76 (C-18, -20), 115.61 (C-14, -24), 103.49 (C-1''), 101.05 (C-1'), 100.81 (C-2'''), 79.87 (C-4'), 74.71 (C-3'), 73.80 (C-8'''), 73.12 (C-5'), 72.84 (C-3'), 72.52 (C-5''), 72.22 (C-2'), 72.06 (C-6'''), 71.27 (C-1), 70.92 (C-7'''), 69.44 (C-4'''), 68.68 (C-4'), 67.62 (C-5'''), 65.02 (C-4), 64.73 (C-1), 63.28 (C-9'''), 62.66 (C-5), 62.33 (C-6'), 62.26 (C-6'), 50.26 (C-8), 45.38 (C-12), 34.41 (C-3'''), 28.99 (C-9), 26.10 (C-11), 22.85 (C-10).

ESI-MS: $\text{C}_{46}\text{H}_{61}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{21}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet 1051.36, gemessen 1051.4;

$\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{Na}_3\text{O}_{21}$ $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$, berechnet 1073.36, gemessen 1073.2

10-[5-(4-(((Z)-4-O-((N-Glycolyl- α -D-neuraminsäure)-(2 \rightarrow 6)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Neu5Gc- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (246)

Ansatz nach AAV 13

Neu5Gc (171): 36 mg (0.104 mmol, 4 Äq.)

CTP: 75 mg (0.155 mmol, 6 Äq.)

CSS: 20 mg

anorganische Pyrophosphatase: 10 μL (12 U)

Lac-D-T-P-Acr (115): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

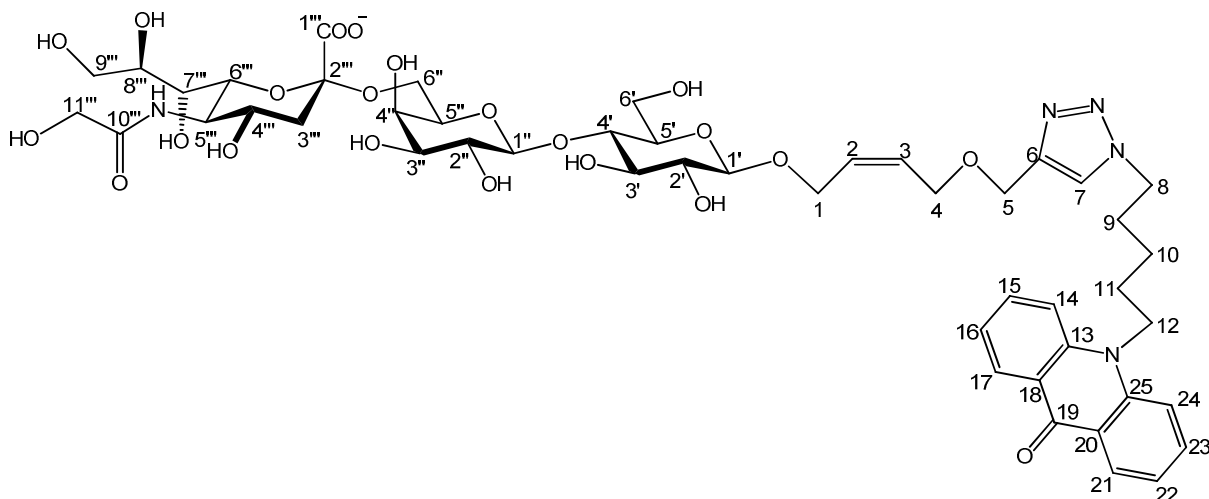
Alkalische Phosphatase: 6 μL (10 U)

α -2,6-SiaT: 60 μL

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl_2 , pH = 8.5): 3 mL

Ausbeute: 23 mg (81% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

$R_f = 0.51$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 40:40:5:15)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.83 – 7.72 (m, 2H, 17-, 21-H), 7.70 (s, 1H, 7-H), 7.28 (dd, J = 28.3, 12.6 Hz, 2H, 15-, 23-H), 6.96 – 6.76 (m, 4H, 14-, 24-, 16-, 22-H), 5.69 – 5.53 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.42 (s, 2H, 5-H), 4.28 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.23 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.20 – 4.10 (m, 3H, 8-, 1a-H), 4.09 – 4.04 (m, 1H, 1b-H), 4.02 (s, 2H, 11''-H), 3.92 – 3.72 (m, 9H, 4-, 9''-a-, 5''-a-, 8''-a-, 6''-a-, 6''-a-, 4''-H), 3.71 – 3.61 (m, 3H, 4''-a-, 5''-a-, 6''-a-H), 3.59 – 3.40 (m, 9H, 6''-b-, 3''-b-, 9''-b-, 12-, 7''-b-, 3'-b-, 4'-b-, 2''-b-H), 3.36 – 3.29 (m, 1H, 5'-H), 3.19 (t, J = 8.2 Hz, 1H, 2'-H), 2.64 (dd, J = 12.4, 4.6 Hz, 1H, 3''-a-H), 1.66 (t, J = 12.2 Hz, 1H, 3''-b-H), 1.58 – 1.45 (m, 2H, 9-H), 1.13 – 0.86 (m, 4H, 11-, 10-H)ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 178.05 (C-19), 175.63 (C-11'''), 173.47 (C-1'''), 143.73 (C-6), 140.50 (C-13, -25), 134.51 (C-15, -23), 129.19 (C-2), 128.96 (C-3), 126.13 (C-17, -21), 124.63 (C-7), 121.60 (C-16, -22), 120.25 (C-18, -20), 114.99 (C-14, -24), 103.25 (C-1'), 100.86 (C-1'), 100.26 (C-2'''), 79.55 (C-4'), 74.63 (C-5'), 74.59 (C-3'), 73.66 (C-5'), 72.58 (C-2'), 72.36 (C-4'), 72.23 (C-3'), 71.81 (C-8'''), 70.74 (C-2''), 68.49 (C-7'''), 68.29 (C-4'''), 68.05 (C-6'''), 65.02 (C-4), 64.58 (C-1), 63.51 (C-9'''), 62.57 (C-6'), 62.23 (C-5), 60.97 (C-11'''), 60.16 (C-6'), 51.49 (C-5'''), 50.02 (C-8), 45.15 (C-12), 40.15 (C-3'''), 28.73 (C-9), 25.68 (C-11), 22.55 (C-10)ppm.

ESI-MS: C₄₈H₆₄N₅O₂₂ [M-Na]⁺, berechnet 1062.40, gemessen 1062.7;

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-((*N*-Azidoacetyl- α -D-neuraminsäure)-(2 \rightarrow 6)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Neu5AcN₃- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (247)

Ansatz nach AAV 13

Neu5AcN₃ (172): 39 mg (0.104 mmol, 4 Äq.)

CTP: 60 mg (0.125 mmol, 4.8 Äq.)

CSS: 10 mg

anorganische Pyrophosphatase: 10 μ L (12 U)

Lac-D-T-P-Acr (115): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

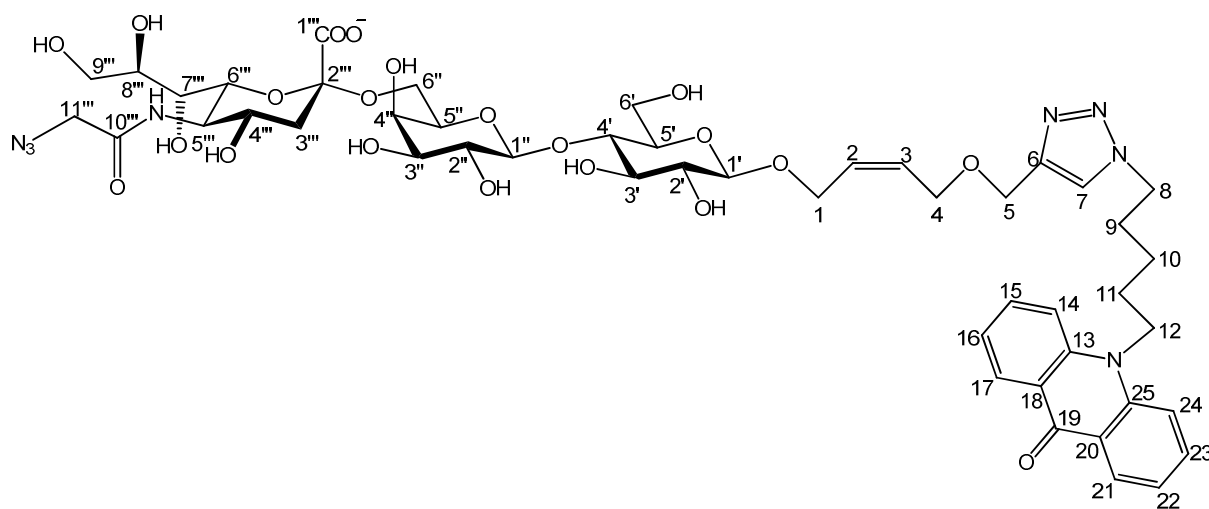
Alkalische Phosphatase: 6 μ L (10 U)

α -2,6-SiaT: 60 μ L

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 3 mL

Ausbeute: 21 mg (78% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

R_f = 0.51 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 40:40:5:15)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.84 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.74 (s, 1H, 7-H), 7.37 (t, J = 7.2 Hz, 2H, 15-, 23-H), 7.03 – 6.88 (m, 4H, 14-, 24-, 16-, 22-H), 5.63 (tdd, J = 17.7, 11.4, 6.6 Hz, 2H, 2-, 3-H), 4.46 (s, 2H, 5-H), 4.30 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.26 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.23 – 4.16 (m, 3H, 8-, 1a-H), 4.08 (dd, J = 12.6, 6.8 Hz, 1H, 1b-H), 3.94 – 3.88

(m, 3H, 4-, 9''á-H), 3.88 – 3.77 (m, 5H, 5'''-, 6'''-, 8'''-, 6á-, 6''a-H), 3.76 – 3.62 (m, 5H, 4'''-, 5'''-, 6'b-, 4'''-, 6''b-H), 3.60 – 3.43 (m, 9H, 12-, 6''b-, 3'''-, 9''b-, 7'''-, 3'-, 4'-, 2''-H), 3.35 (ddd, $J = 9.2, 5.1, 2.3$ Hz, 1H, 5'-H), 3.21 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H, 2'-H), 2.66 (dd, $J = 12.4, 4.7$ Hz, 1H, 3''á-H), 1.68 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H, 3''b-H), 1.63 – 1.54 (m, 2H, 9-H), 1.19 – 1.07 (m, 2H, 11-H), 1.06 – 0.95 (m, 2H, 10-H)ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 178.22$ (C-19), 173.46 (C-1'''), 171.03 (C-10'''), 143.78 (C-6), 140.64 (C-13, -25), 134.62 (C-15, -23), 129.22 (C-2), 128.99 (C-3), 126.19 (C-17, -21), 124.68 (C-7), 121.71 (C-16, -22), 120.34 (C-18, -20), 115.10 (C-14, -24), 103.25 (C-1'''), 100.91 (C-1'), 100.27 (C-2'''), 79.60 (C-4'), 74.65 (C-5'), 74.60 (C-3'), 73.70 (C-5'''), 72.61 (C-2'), 72.39 (C-3'''), 72.20 (C-4'''), 71.84 (C-8'''), 70.76 (C-2''), 68.51 (C-7'''), 68.36 (C-6'''), 68.17 (C-4'''), 64.97 (C-4), 64.61 (C-1), 63.56 (C-9'''), 62.63 (C-6'''), 62.24 (C-5), 60.20 (C-6'), 51.89 (C-5'''), 50.07 (C-8), 45.19 (C-12), 40.16 (C-3'''), 28.74 (C-9), 25.75 (C-11), 22.59 (C-10)ppm.

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-((*N*(Hex-5-ynoyl)- α -D-neuraminoäure)-(2→6)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Neu5Hex- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (248)

Ansatz nach AAV 12

CMP-Neu5Hex (210): 71 mg (0.104 mmol, 4 Äq.)

Lac-D-T-P-Acr (115): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

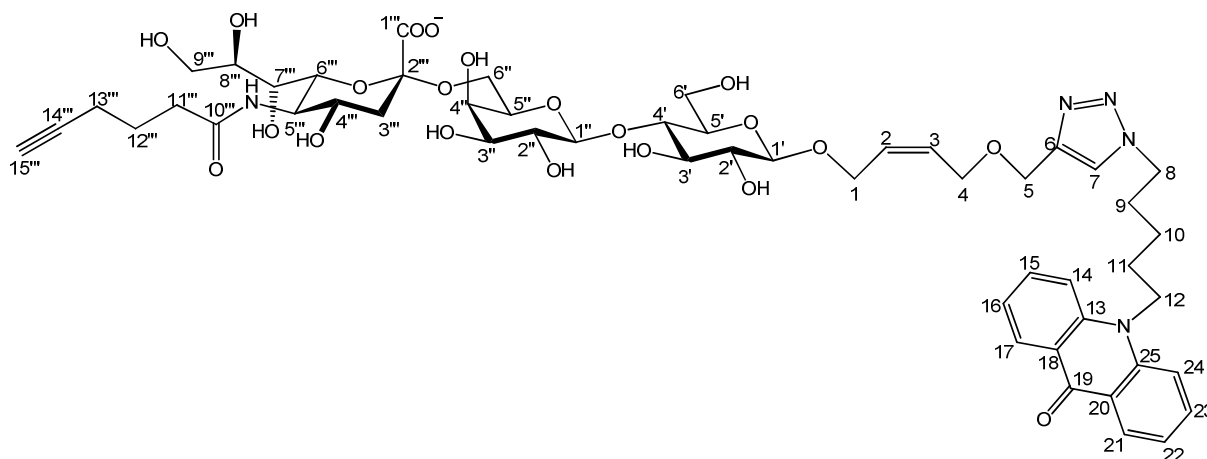
Alkalische Phosphatase: 6 μL (10 U)

α -2,6-SiaT: 60 μL

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl_2 , pH = 8.5): 4 mL

Ausbeute: 25 mg (87% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

$R_f = 0.39$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/ H_2O = 40:40:5:15)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 7.80 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.74 (s, 1H, 7-H), 7.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H, 15-, 23-H), 6.90 (dd, J = 15.6, 8.0 Hz, 4H, 14-, 24-, 16-, 22-H), 5.74 – 5.48 (m, 2H, 5-H), 4.49 – 4.41 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.32 (d, J = 7.7 Hz, 1H, 1'-H), 4.29 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.26 – 4.16 (m, 3H, 1a-, 8-H), 4.11 (dd, J = 12.6, 7.0 Hz, 1H, 1b-H), 3.97 – 3.89 (m, 3H, 4-, 9'-a-H), 3.88 – 3.77 (m, 6H, 6''', 8''', 6a-, 6'a-, 5'''-H), 3.77 – 3.44 (m, 17H, 5''', 6'b-, 4''', 3''', 6''b-, 9''b-, 3'', 12-, 4'', 7'''-, 2''-H), 3.38 (ddd, J = 9.3, 5.0, 2.1 Hz, 1H, 5'-H), 3.23 (t, J = 8.5 Hz, 1H, 2'-H), 2.66 (dd, J = 12.3, 4.6 Hz, 1H, 3'''a-H), 2.37 – 2.29 (m, 2H, 11'''-H), 2.28 (t, J = 2.6 Hz, 1H, 15'''-H), 2.18 – 2.07 (m, 2H, 13'''-H), 1.76 – 1.63 (m, 3H, 12'''-, 3'''b-H), 1.61 – 1.50 (m, 2H, 9-H), 1.15 – 1.03 (m, 2H, 11-H), 1.02 – 0.93 (m, 2H, 10-H);

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ 178.09 (C-19), 176.83 (C-1'''), 173.49 (C-10'''), 140.57 (C-13, -25), 134.54 (C-15, -23), 129.28 (C-2), 128.97 (C-3), 126.20 (C-17, -21), 124.65 (C-7), 121.63 (C-16, -22), 120.34 (C-18, -20), 114.98 (C-14, -24), 103.25 (C-1'), 100.97 (C-1'), 100.28 (C-2'''), 84.65 (C-14'''), 79.62 (C-4'), 74.68 (C-5'), 74.63 (C-3'), 73.71 (C-5'''), 72.64 (C-2'), 72.55 (C-4'''), 72.43 (C-3'''), 71.87 (C-8'''), 70.78 (C-2'''), 69.98 (C-15'''), 68.67 (C-7'''), 68.56 (C-6'''), 68.26 (C-4''') 65.11 (C-4), 64.67 (C-1), 63.52 (C-9'''), 62.71 (C-6'''), 62.30 (C-5), 60.26 (C-6'), 51.77 (C-5'''), 50.04 (C-8), 45.20 (C-12), 40.29 (C-3'''), 34.61 (C-11'''), 28.80 (C-9), 25.74 (C-11), 24.01 (C-12'''), 22.61 (C-10), 17.03 (C-13''').

ESI-MS: $\text{C}_{52}\text{H}_{68}\text{N}_5\text{O}_{21}$ $[\text{M}-\text{Na}]^-$, berechnet 1098.4, gemessen 1098.8;

$\text{C}_{52}\text{H}_{68}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{21}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet 1144.42, gemessen 1144.8;

10-[5-(4-(((Z)-4-*O*-((N-Benzoyl- α -D-neuraminsäure)-(2 \rightarrow 6)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Neu5Bz- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (249)

Ansatz nach AAV 13

Neu5Bz (175): 61 mg (0.156 mmol, 6 Äq.)

CTP: 90 mg (0.187 mmol, 7.2 Äq.)

CSS: 45 mg

anorganische Pyrophosphatase: 10 μ L (12 U)

Lac-D-T-P-Acr (115): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

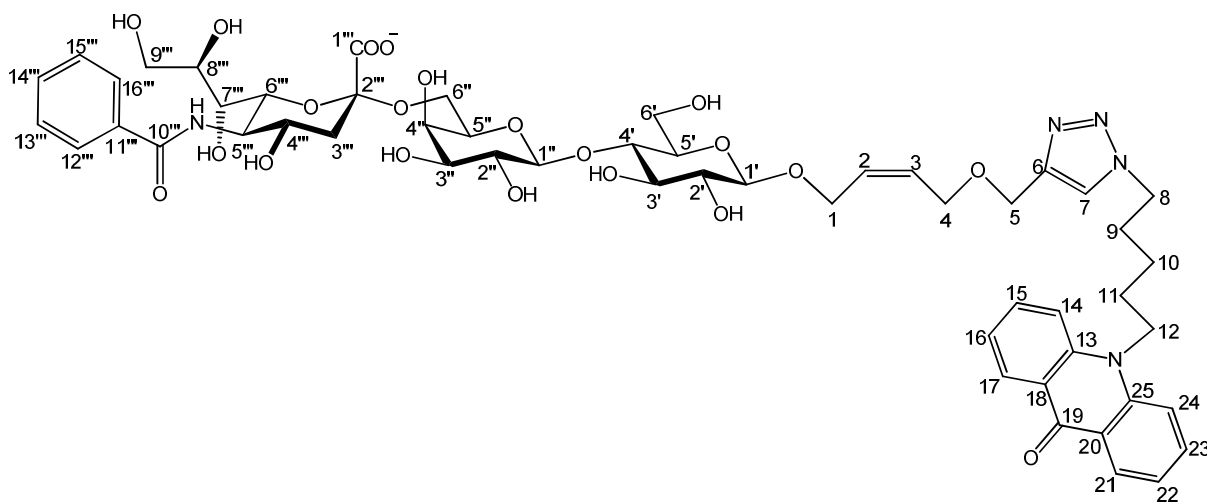
Alkalische Phosphatase: 6 μ L (10 U)

α -2,6-SiaT: 60 μ L

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 4 mL

Ausbeute: 35 mg (98% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

$R_f = 0.49$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 40:40:5:15)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 7.74 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.67 (s, 1H, 7-H), 7.62 – 7.56 (m, 2H, 12'''-, 16'''-H), 7.35 (dd, $J = 11.8, 4.3$ Hz, 1H, 14'''-H), 7.27 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, 13'''-, 15'''-H), 7.22 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 15-, 23-H), 6.87 – 6.71 (m, 4H, 14-, 24-, 16-, 22-H), 5.72 – 5.52 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.41 (s, 2H, 5-H), 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 1'-H), 4.31

(d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1'-H), 4.22 (dd, $J = 12.6, 6.0$ Hz, 1H, 1a-H), 4.16 – 4.07 (m, 3H, 1b-, 8-H), 4.04 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H, 5'''-H), 3.96 – 3.92 (m, 3H, 9'''a-, 4-H), 3.90 – 3.66 (m, 8H, 6'''-, 8'''-, 6'a-, 6''a-, 4''-, 4'''-, 5''-, 6'b-H), 3.63 – 3.45 (m, 8H, 3''-, 9''b-, 6''b-, 3'-, 7'''-, 4'-, 2'-H), 3.44 – 3.34 (m, 3H, 12-, 5'-H), 3.25 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, 2'-H), 2.72 (dd, $J = 12.3, 4.6$ Hz, 1H, 3'''a-H), 1.76 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H, 3''b-H), 1.53 – 1.34 (m, 2H, 9-H), 1.06 – 0.80 (m, 4H, 11-, 10-H).

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ 177.93 (C-19), 173.57 (C-1'''), 171.36 (C-10'''), 143.77 (C-6), 140.47 (C-13, -25), 134.42 (C-15, -23), 133.25 (C-11'''), 132.08 (C-14'''), 129.36 (C-2), 128.89 (C-3), 128.56 (C-13''', -15'''), 127.09 (C-12''', -16'''), 126.18 (C-17, -21), 124.55 (C-7), 121.51 (C-16, -22), 120.34 (C-18, -20), 114.83 (C-14, -24), 103.21 (C-1'''), 101.04 (C-1'), 100.26 (C-2'''), 79.67 (C-4'), 74.70 (C-5'), 74.62 (C-3'), 73.75 (C-5'''), 72.67 (C-2'), 72.59 (C-4'''), 72.44 (C-3'''), 71.90 (C-8'''), 70.77 (C-2''), 68.68 (C-7'''), 68.54 (C-6'''), 68.20 (C-4'''), 65.20 (C-4), 64.70 (C-1), 63.58 (C-9'''), 62.73 (C-6''), 62.29 (C-5), 60.29 (C-6'), 52.51 (C-5'''), 49.94 (C-8), 45.14 (C-12), 40.44 (C-3'''), 28.79 (C-9), 25.69 (C-11), 22.59 (C-10).

ESI-MS: $\text{C}_{53}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_{21}$ $[\text{M}-\text{Na}]^-$, berechnet 1108.43, gemessen 1108.4;

$\text{C}_{53}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{21}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet 1154.4, gemessen 1153.7;

$\text{C}_{53}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{21}$ $[\text{M}-\text{Na} + 2\text{H}]^+$, berechnet 1110.4, gemessen 1109.7;

10-[5-(4-(((Z)-4-O-((N-Methylsulfonyl- α -D-neuraminsäure)-(2 \rightarrow 6)- β -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-acridin-9(10H)-on (Neu5Ms- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (250)

Ansatz nach AAV 13

Neu5Ms (176): 15 mg (0.040 mmol, 6 Äq.)

CTP: 23 mg (0.048 mmol, 7.2 Äq.)

CSS: 70 mg

anorganische Pyrophosphatase: 5 μL (6 U)

Lac-D-T-P-Acr (115): 5 mg (6.607 μmol , 1 Äq.)

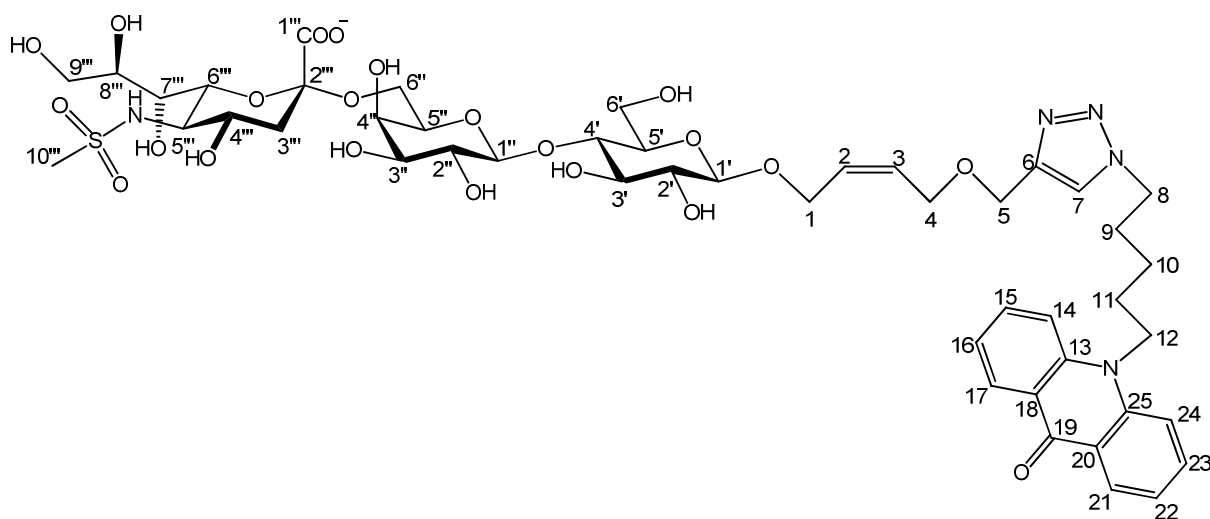
Alkalische Phosphatase: 5 μ L

α -2,6-SiaT: 20 μ L

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 1.8 mL

Ausbeute: 4.5 mg (62% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

$R_f = 0.29$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 40:40:5:15)



ESI-MS: C₄₇H₆₄N₅O₂₂S [M-Na]⁻, berechnet 1082.4, gemessen 1082.7;

C₄₇H₆₃N₅NaO₂₂S [M-H]⁻, berechnet 1104.36, gemessen 1104.7

***N*-(6-(4-(Hepta-*O*-acetyl- β -lactosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanamido-D-neuraminsäure- α -(2 \rightarrow 6)-5-*N*-(6-(4- β -D-Lactosyl-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure (LacAc₇-CH₂-T-L-Sia- α -2,6-Lac-CH₂-T-L-Sia) (255)**

Ansatz nach AAV 13

LacAc₇-CH₂-T-L-Sia (**194**): 50 mg (0.048 mmol, 3 Äq.)

CTP: 28 mg (0.058 mmol, 3.6 Äq.)

CSS: 42 mg

anorganische Pyrophosphatase: 16 μ L (8 U)

Lac-CH₂-T-L-Sia (**195**): 13 mg (0.016 mmol, 1 Äq.)

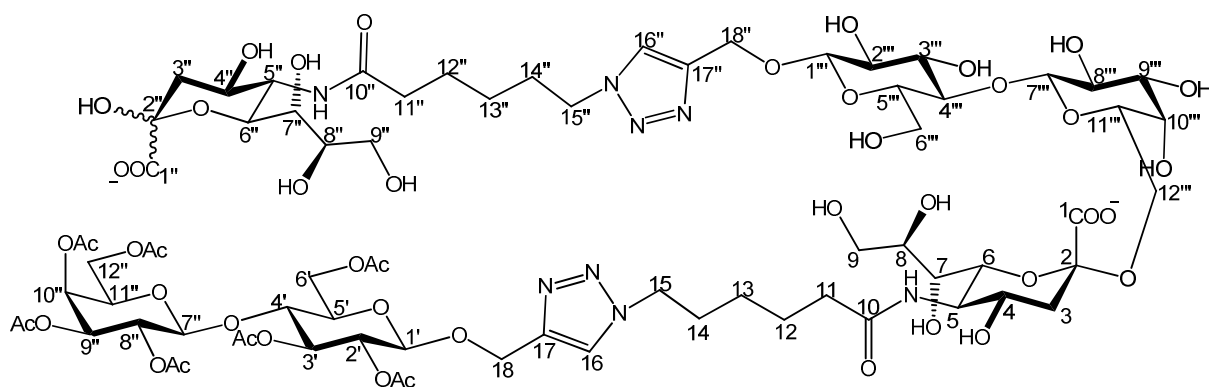
Alkalische Phosphatase: 20 µL

α-2,6-SiaT: 60 µL

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 2.5 mL

Ausbeute: 24 mg (83% bezogen auf Lac-CH₂-T-L-Sia), als farbloser Feststoff

$R_f = 0.30$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23)



¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.01 (s, 1H, 16''-H), 7.95 (s, 1H, 16-H), 5.35 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, 10'-H), 5.18 – 5.06 (m, 2H, 3', 9'-H), 4.98 – 4.89 (m, 2H, 8', 18''a-H), 4.88 – 4.73 (m, 5H, 18''b-, 12', 1', 2'-H), 4.66 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 7'-H), 4.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1'''-H), 4.43 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, 6'a-H), 4.37 (m, 5H, 15-, 15''-, 7'''-), 4.16 – 4.08 (m, 4H, 18-, 11', 6'b-H), 4.05 – 3.99 (m, 1H, 11'''-H), 3.96 (dd, $J = 10.2, 4.7$ Hz, 1H), 3.94 – 3.85 (m, 6H), 3.85 – 3.70 (m, 12H), 3.70 – 3.51 (m, 15H), 3.51 – 3.41 (m, 5H), 3.30 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, 2'''-H), 2.65 (ddd, $J = 12.8, 4.5$ Hz, 2H, 3a-H), 2.27 – 2.16 (m, 4H, 11-, 11''-H), 2.16 – 2.12 (m, 4H, 3''a-, COCH₃), 2.11 (s, 3H, COCH₃), 2.06 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 6H, COCH₃), 2.04 (s, 3H, COCH₃), 1.93 (s, 3H, COCH₃), 1.92 (s, 3H, COCH₃), 1.89 – 1.81 (m, 4H, 14-, 14''-H), 1.76 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H, 3''b-H), 1.66 (t, $J = 12.7$ Hz, 1H, 3b-H), 1.55 (dq, $J = 15.5, 7.6$ Hz, 4H, 12-, 12''-H), 1.29 – 1.16 (m, 4H, 13-, 13''-H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 177.52 (C-1), 177.40 (C-1''), 173.63, 173.42, 173.19, 172.97, 172.67, 172.47, 172.38 (COCH₃), 143.51 (C-17), 143.27 (C17''), 125.25 (C-16), 125.21 (C-16''), 103.22 (C-7'''), 101.26 (C-1'''), 100.30 (C-7'), 100.11 (C-2), 99.38 (C-1'), 99.33 (C-2''), 79.53 (C-9'), 75.33 (C-11'''), 74.68 (C-4'''), 74.61 (C-5'''), 73.67 (C-3'), 73.21 (C-2'''), 72.65 (C-9'''), 72.58 (C-11'), 72.39 (C-5'), 72.24 (C-2'), 71.72, 71.62, 71.56, 71.25, 70.80 (C-6),

70.34 (C-8[“]), 69.80 (C-8[‘]), 68.54 (C-7[“]), 68.51 (C-7), 68.15 (C-4), 68.05 (C-4[“]), 67.81 (C-10[‘]), 67.04 (C-10[“]), 63.49 (C-9[“]), 63.20 (C-9), 62.64 (C-12[“]), 62.44 (C-6[‘]), 62.26 (C-12[‘]), 62.03 (C-18[“]), 61.76 (C-18), 60.25 (C-6[“]), 52.14 (C-5[“]), 51.74 (C-5), 50.21 (C-15, -15[“]), 40.26 (C-3[“]), 39.49 (C-3), 35.71 (C-11[“]), 35.62 (C-11), 29.09 (C-14[“]), 29.05 (C-14), 25.14 (C-13, -13[“]), 24.72 (C-12[“]), 24.66 (C-12), 20.40, 20.35, 20.20, 20.12, 20.10, 20.00, 19.90 (COCH₃) ppm.

ESI-MS: C₇₄H₁₁₁N₈Na₂O₄₆ [M+H]⁺: berechnet 1893.64, gemessen 1893.8;

C₇₄H₁₁₂N₈NaO₄₆ [M-Na+2H]⁺: berechnet 1871.66, gemessen 1871.8;

C₇₄H₁₁₀N₈Na₃O₄₆ [M+Na]⁺: berechnet 1915.62, gemessen 1915.8;

5-*N*-(6-(4-(Hepta-*O*-acetyl-β-D-lactosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanamido-D-neuraminsäure-α-(2→6)-β-D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (LacAc₇-CH₂-T-L-Sia-α-2,6-Lac-D-T-P-Acr) (256)

Ansatz nach AAV 13

LacAc₇-CH₂-T-L-Sia (**194**): 81 mg (0.078 mmol, 3 Äq.)

CTP: 45 mg (0.094 mmol, 3.6 Äq.)

CSS: 75 mg

anorganische Pyrophosphatase: 24 μL (12 U)

Lac-D-T-P-Acr (**115**): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

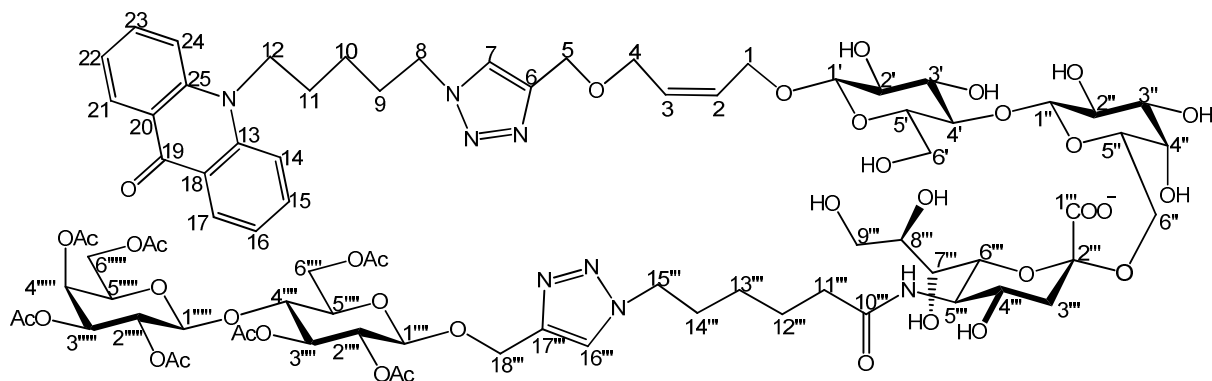
Alkalische Phosphatase: 20 μL

α-2,6-SiaT: 60 μL

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 2.5 mL

Ausbeute: 36 mg (76% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr), als hellgelber Feststoff

R_f = 0.42 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 40:40:5:15)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.07 (d, J = 7.6 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.95 (s, 1H, 7-H), 7.83 (s, 1H, 16^{'''}-H), 7.58 (dd, J = 9.3, 6.8 Hz, 2H, 15-, 23-H), 7.35 – 7.23 (m, 2H, 14-, 24-H), 7.19 – 7.03 (m, 2H, 16-, 22-H), 5.77 – 5.59 (m, 2H, 2-, 3-H), 5.31 (d, J = 3.1 Hz, 1H, 4^{''''}-H), 5.15 – 5.08 (m, 3H, 3^{'''}-, 3^{''''}-, 2^{''''}-H), 5.05 (dd, J = 10.3, 3.0 Hz, 1H), 5.02 – 4.76 (m, 7H, 18^{''}a-, 1^{'''}-, 2^{'''}, 18^{''}b-, 1^{''''}-, 6^{''''}-H), 4.62 (dd, J = 8.4 Hz, 1H, 1^{''}-H), 4.54 – 4.47 (m, 2H, 5-H), 4.46 – 4.27 (m, 6H, 6^{''''}a-, 8-, 15^{'''}-, 1^{''}-H), 4.24 (dd, J = 12.9, 6.1 Hz, 1H, 1a-H), 4.14 (m, 4H), 4.05 – 3.37 (m, 27H), 3.26 (t, J = 8.5 Hz, 1H, 2^{''}-H), 2.67 (m, 1H, 3^{''}a-H), 2.24 (dt, J = 10.4, 7.4 Hz, 3H, 11^{'''}-H), 2.15 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.92 (s, 3H, COCH_3), 1.90 – 1.82 (m, 2H, 14^{'''}-H), 1.73 (m, 4H, 9-, 3^{''}b-H), 1.61 – 1.51 (m, 2H, 12^{'''}-H), 1.51 – 1.38 (m, 2H, 11-H), 1.26 – 1.09 (m, 4H, 13^{'''}-, 10-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 178.43 (C-19), 177.35 (C-1^{'''}), 176.96 (C-10^{'''}), 173.66, 173.46, 173.22, 172.71, 172.58, 172.51, 172.46 (COCH_3), 143.24 (C-17^{'''}), 143.22 (C-6), 141.06 (C-13, -25), 134.91 (C-15, -23), 129.45 (C-2), 128.94 (C-3), 126.54 (C-17), 126.51 (C-21), 125.23 (C-7), 125.20 (C-16^{'''}), 121.95 (C-16, -22), 120.70 (C-18, -20), 115.46 (C-14, -24), 103.18 (C-1^{''}), 100.14 (C-1^{''''}), 99.99 (C-2^{'''}), 99.39 (C-1[']), 99.31 (C-1^{'''}), 79.78 (C-4[']), 75.40 (C-5^{''}), 75.38 (C-4^{'''}), 74.72 (C-5[']), 74.63 (C-6^{''}), 73.24 (C-3^{''}), 72.66, 72.61, 72.23, 71.56, 71.25, 70.35, 70.31, 69.81, 69.41, 68.71, 68.65, 68.56, 68.17, 67.82, 67.69 (C-4^{''}), 65.82 (C-4), 65.13 (C-1), 64.74 (C-9^{'''}), 63.26 (C-5), 62.30 (C-6^{''}, -6^{'''}), 61.78 (C-6^{''''}, -18^{'''}), 60.35 (C-6[']), 53.16 (C-12), 51.80 (C-5^{'''}), 50.23 (C-15^{'''}) 50.09 (C-8), 39.43 (C-3^{'''}), 35.49 (C-11^{'''}), 29.11 (C-9, -14^{'''}), 25.10 (C-13^{'''}), 25.09 (C-10), 24.78 (C-12^{'''}), 24.57 (C-11), 20.44, 20.40, 20.23, 20.17, 20.13, 20.03, 19.94 (COCH_3) ppm.

Madi-MS: $\text{C}_{81}\text{H}_{109}\text{N}_8\text{Na}_2\text{O}_{39}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 1863.66, gemessen 1863.5

5-*N*-(6-(4-(β -D-lactosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure- α -(2 \rightarrow 6)- β -D-lactosyloxy-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Lac-CH₂-T-L-Sia- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (**258a**)

5-*N*-(6-(4-(β -D-lactosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure- α -(2 \rightarrow 6)-*N*-(6-(4-(β -D-lactosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure- α -(2 \rightarrow 6)- β -D-lactosyloxy-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on (Lac-CH₂-T-L-Sia- α -2,6-Lac-CH₂-T-L-Sia- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (**258b**)

Lac-CH₂-T-L-Sia-(α -2,6-Lac-CH₂-T-L-Sia)₂- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr (**258c**)

Lac-CH₂-T-L-Sia-(α -2,6-Lac-CH₂-T-L-Sia)₃- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr (**258d**)

Ansatz nach AAV 13

Lac-CH₂-T-L-Sia (**195**): 141 mg (0.174 mmol, 6 Äq.)

CTP: 126 mg (0.261 mmol, 9 Äq.)

CSS: 120 mg

anorganische Pyrophosphatase: 40 μ L (20 U)

Lac-D-T-P-Acr (**115**): 22 mg (0.029 mmol, 1 Äq.)

Alkalische Phosphatase: 20 μ L

α -2,6-SiaT: 80 μ L

Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 5 mL

Ausbeute: 10 mg Produkt **258a** (22% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr als hellgelber Feststoff)

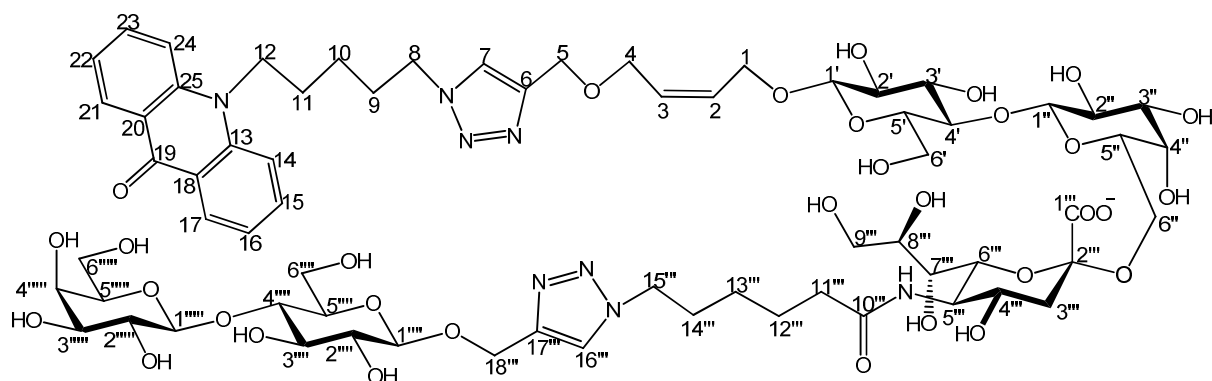
8 mg Produkt **258b** (10% bezogen auf Lac-D-T-P-Acr als hellgelber Feststoff)

R_f = 0.42 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23) für Produkt **258a**

R_f = 0.21 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23) für Produkt **258b**

R_f = 0.12 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23) für Produkt **258c**

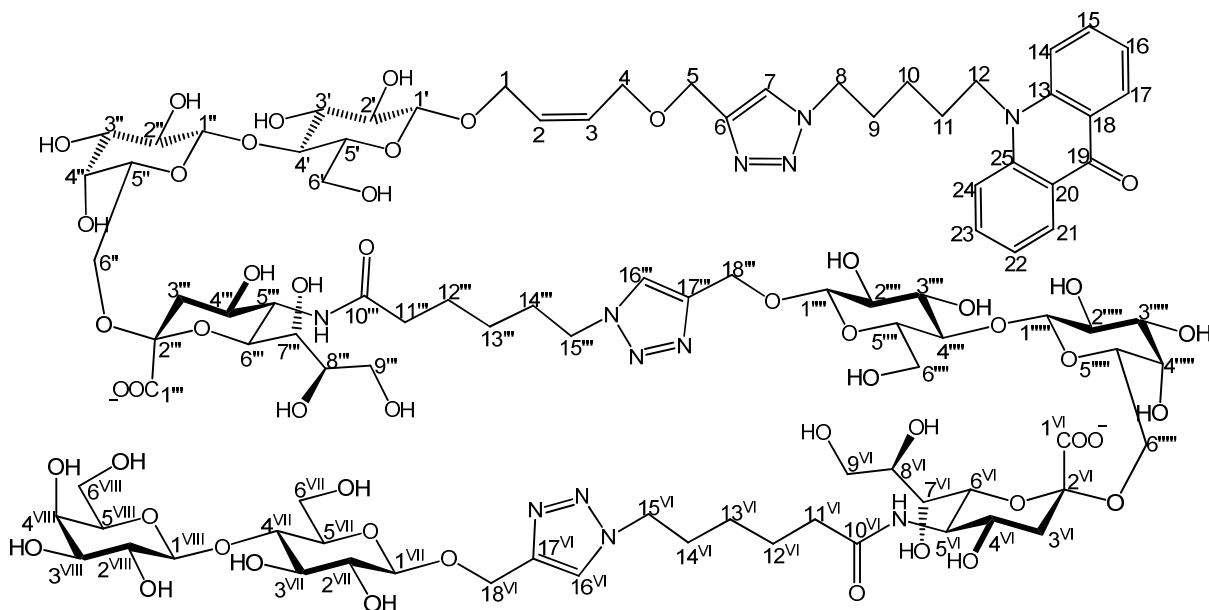
R_f = 0.06 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23) für Produkt **258d**



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.00 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.87 (s, 1H, 16^{'''}-H), 7.79 (s, 1H, 7-H), 7.55 (t, J = 7.6 Hz, 2H, 15-, 23-H), 7.22 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 14-, 24-H), 7.11 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 16-, 22-H), 5.65 (dtd, J = 17.8, 11.6, 6.5 Hz, 2H, 2-, 3-H), 4.81 (d, J = 12.6 Hz, 1H, 18^{'''a}-H), 4.73 (d, 1H, 18^{'''b}-H), 4.49 (s, 2H, 5-H), 4.44 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1^{'''}-H), 4.36 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1^{''}-H), 4.32 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1^{''''}-H), 4.28 (d, J = 7.9 Hz, 3H, 1[']-, 15^{'''}-H), 4.26 – 4.16 (m, 3H, 8-, 1a-H), 4.08 (dd, J = 12.6, 7.0 Hz, 1H, 1b-H), 3.95 – 3.87 (m, 4H, 4-, 9^{'''a}-, 6^{'''a}-H), 3.88 – 3.77 (m, 9H, 6^{'''b}-, 3^{'''}-, 12-, 6^{'''a}-, 7^{'''}-, 5^{'''}-H), 3.60 (m, 23H, 6^{'''}-, 6^{'''}-, 6^{'''}-, 4^{'''}-, 4^{'''}-, 6^{'''}-, 5^{'''}-, 4^{'''}-, 7^{'''}-, 4^{'''}-, 4^{'''}-, 3^{'''}-, 3^{'''}-, 2^{'''}-, 2^{'''}-H), 3.42 – 3.35 (m, 1H, 5[']-H), 3.23 (dd, J = 16.3, 8.1 Hz, 2H, 2^{'''}-, 2[']-H), 2.66 (dd, J = 12.4, 4.6 Hz, 1H, 3^{'''a}-H), 2.16 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 11^{'''}-H), 1.79 – 1.64 (m, 5H, 14^{'''}-, 9-, 3^{'''b}-H), 1.53 – 1.43 (m, 2H, 12^{'''}-H), 1.38 – 1.28 (m, 2H, 11-H), 1.19 – 1.06 (m, 4H, 13^{'''}-, 10-H) ppm.

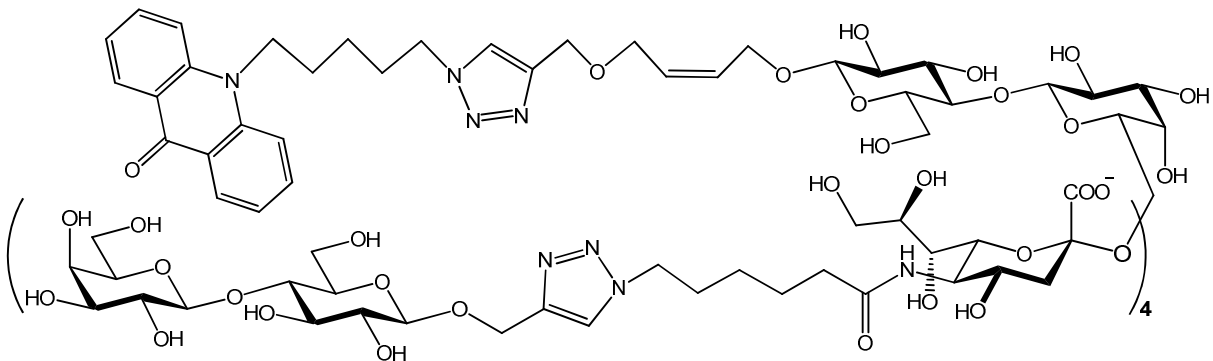
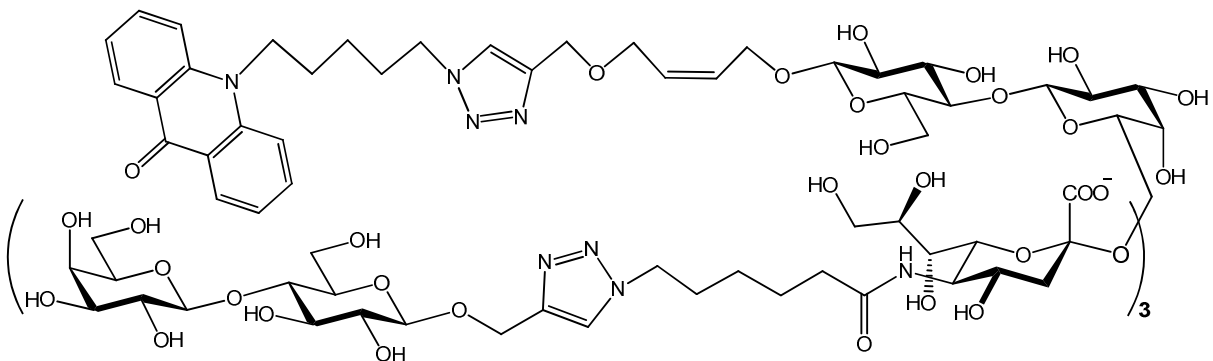
^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 178.58 (C-19), 177.53 (C-1^{'''}), 173.49 (C-10^{'''}), 143.31 (C-17^{'''}), 143.29 (C-6), 140.96 (C-13, -25), 134.87 (C-15, -23), 129.27 (C-2), 128.97 (C-3), 126.34 (C-17, -21), 125.07 (C-7), 124.79 (C-16^{'''}), 121.95 (C-16, -22), 120.50 (C-18, -20), 115.46 (C-14, -24), 103.20 (C-1^{''''}), 102.93 (C-1^{''}), 101.31 (C-1^{'''}), 100.98 (C-1[']), 100.24 (C-2^{'''}), 79.63 (C-4^{'''}), 78.29 (C-4[']), 75.33 (C-5^{'''}), 74.77 (C-5^{''}), 74.67 (C-5[']), 74.62, 74.32, 73.72, 72.68, 72.58, 72.54, 72.42, 71.76, 70.95, 70.77 (C-8^{'''}), 68.55, 68.52 (C-7^{'''}), 68.18 (C-4^{'''}), 64.90 (C-4), 64.63 (C-1), 63.54 (C-9^{'''}), 62.64 (C-5), 62.20 (C-18^{'''}), 61.96 (C-6^{'''}), 61.00 (C-6^{'''}), 60.25 (C-6[']), 60.06 (C-6^{'''}), 51.75 (C-5^{'''}), 50.11 (C-8, -15^{'''}), 45.35 (C-12), 40.33 (C-3^{'''}), 35.58 (C-11^{'''}), 28.95 (C-9), 28.76 (C-14^{'''}), 25.07 (C-13^{'''}), 24.60 (C-12^{'''}), 22.68 (C-10) ppm.

Lac-CH₂-T-L-Sia-α-2,6-Lac-CH₂-T-L-Sia-α-2,6-Lac-D-T-P-Acr (258b)



^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.13 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 17-, 21-H), 7.93 (s, 1H, 16^{VI}-H), 7.89 (s, 1H, 16^{IV}-H), 7.80 (s, 1H, 7-H), 7.68 (t, J = 7.8 Hz, 2H, 15-, 23-H), 7.41 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 14-, 24-H), 7.23 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 16-, 22-H), 5.73 – 5.57 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.85 (dd, J = 12.6, 9.6 Hz, 2H, 18^{VI}a-, 18^{IV}a-H), 4.75 (m, 2H, 18^{VI}b, 18^{IV}b-H), 4.52 – 4.45 (m, 4H, 1^{VII}-, 1^{IV}-, 5-H), 4.40 – 4.22 (m, 10H, 15^{VI}-, 15^{IV}-, 1^{IV}-, 1^{VIII}-, 1^I-, 8, 1^I-H), 4.18 (dd, J = 12.6, 6.3 Hz, 1H, 1a-H), 4.11 – 4.02 (m, 3H, 1b-, 12-H), 3.95 – 3.85 (m, 8H, 4-, 6^{IV}-, 4^I-, 8^{IV}-, 8^I-, 4^{VIII}-, 9^{VI}a-), 3.85 – 3.62 (m, 19H), 3.62 – 3.45 (m, 21H), 3.42 – 3.35 (m, 1H, 5^I-H), 3.32 – 3.19 (m, 3H, 2^{VII}-, 2^{IV}-, 2^I-H), 2.70 – 2.62 (m, 2H, 3^{VI}a-, 3^{IV}a-H), 2.23 – 2.12 (m, 4H, 11^{VI}-, 11^{IV}-H), 1.78 (m, 6H, 9-, 14^{VI}-, 14^{IV}-H), 1.68 (td, J = 12.2, 5.3 Hz, 2H, 3^{VI}b-, 3^{IV}b-H), 1.50 (m, 6H, 11-, 12^{VI}-, 12^{IV}-H), 1.25 – 1.11 (m, 6H, 10-, 13^{VI}-, 13^{IV}-H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 177.55 (C-1^{VI}, -1^{IV}), 173.50 (C-10^{VI}, -10^{IV}), 143.80 (C-6), 143.39 (C-17^{VI}), 143.36 (C-17^{IV}), 141.19 (C-13, -25), 135.02 (C-15, -23), 128.97 (C-2), 128.75 (C-3), 126.44 (C-17, -21), 125.18 (C-16^{VI}), 125.09 (C-16^{IV}), 124.82 (C-7), 122.08 (C-16, -22), 120.62 (C-18, -20), 115.70 (C-14, -24), 103.22 (C-1^I), 103.19 (C-1^{VIII}), 102.93 (C-1^I), 101.32 (C-1^{VII}), 101.26 (C-1^{IV}), 100.30 (C-2^{VI}), 100.24 (C-2^{IV}), 81.75 (C-3^I), 79.61 (C-4^{VII}), 79.54 (C-4^{IV}), 75.34 (C-5^{VIII}), 74.79 (C-5^I), 74.66 (C-5^{VII}, -5^{IV}), 74.61 (C-5^{IV}, -5^I), 74.33, 73.73, 73.70, 73.69, 72.70, 72.61, 72.58, 72.54, 72.42, 72.38, 71.76, 70.95 (C-4^{VIII}), 70.79 (C-4^I), 70.77 (C-4^{IV}), 68.56 (C-4^I), 68.52 (C-7^{VI}, -7^{IV}), 68.18 (C-4^{VI}, -4^{IV}), 64.82 (C-4), 64.62 (C-1), 63.55 (C-9^{IV}), 63.53 (C-^{VI}), 62.64 (C-5), 62.63 (C-18^{VI}, -18^{IV}), 62.00 (C-6^{VIII}, -6^I), 61.11 61.01 (C-6^{VII}, -6^{IV}), 60.26 (C-6^{IV}, -6^I), 51.76 (C-5^{IV}), 51.73 (C-5^{VI}), 50.19 (C-8), 50.17 (C-15^{IV}), 50.12 (C-15^{VI}), 45.37 (C-12), 40.33 (C-3^{IV}), 40.30 (C-3^{VI}), 35.62 (C-11^{IV}), 35.58 (C-



Madi-MS: Produkt **258a**: C₆₇H₉₅N₈Na₂O₃₂ [M+Na]⁺: berechnet 1569.58, gemessen 1570.0;

Produkt **258b**: $\text{C}_{97}\text{H}_{142}\text{N}_{12}\text{Na}_3\text{O}_{51}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 2360.86, gemessen 2361.2;

Produkt **258c**: $\text{C}_{127}\text{H}_{189}\text{N}_{16}\text{Na}_4\text{O}_{70}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 3151.13, gemessen 3152.1;

Produkt **258d**: C₁₅₇H₂₃₆N₂₀Na₅O₈₉ [M+Na]⁺: berechnet 3941.4, gemessen 3942.7

N-(4-(1-(7-Diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-butanoyl-D-neuraminsäure- α -(2 \rightarrow 6)-*N*-(6-(4-(β -D-lactosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure- α -(2 \rightarrow 6)- β -D-lactosyloxy-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on
(Et₂NCoum-L-Sia- α -2,6-Lac-CH₂-T-L-Sia- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (259a)

5-*N*-(4-(1-(7-diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butanoyl-D-neuraminsäure- α -(2 \rightarrow 6)-5-*N*-(6-(4-(β -D-lactosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure- α -(2 \rightarrow 6)-5-*N*-(6-(4-(β -D-lactosyl)-methoxyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-hexanoyl-D-neuraminsäure- α -(2 \rightarrow 6)- β -D-lactosyloxy-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridin-9-on
(Et₂NCoum-L-Sia-(α -2,6-Lac-CH₂-T-L-Sia)₂- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr) (259b)

Reaktion in einer Kaskade

Zuerst Synese von Lac-CH₂-T-L-Sia-(α -2,6-Lac-CH₂-T-L-Sia)_n- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr:

Ansatz nach AAV 13

Lac-CH₂-T-L-Sia (**195**): 128 mg (0.158 mmol, 8 Äq.)

CTP: 92 mg (0.190 mmol, 9.6 Äq.)

CSS: 100 mg

anorganische Pyrophosphatase: 30 μ L (15 U)

Lac-D-T-P-Acr (**115**): 15 mg (0.020 mmol, 1 Äq.)

Alkalische Phosphatase: 20 μ L

α -2,6-SiaT: 80 μ L

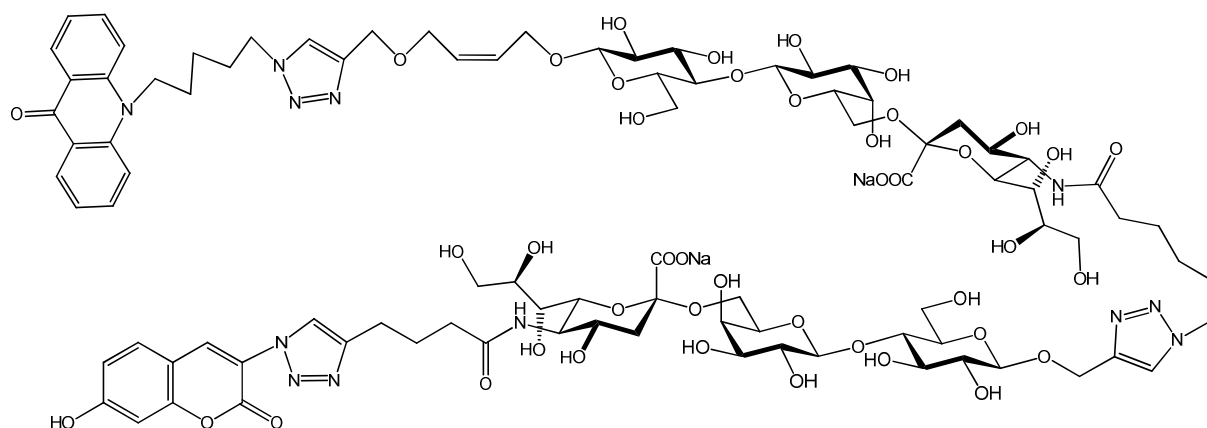
Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgCl₂, pH = 8.5): 7 mL

Wenn die DC-Kontrolle für diese Reaktion keine weitere Umsetzung zeigt, werden 96 mg (0.10 mmol, 1 Äq.) CMP-Sia-CoumNEt₂ (**218**) und 50 μ L α -2,6-SiaT in der Reaktionsmischung portionsweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird weiter bei 30 °C geschüttelt, bis kein CMP-Sia-CoumNEt₂ auf DC beobachtet ist. Anschließend wird diese Mischung direkt in der Säule, die mit RP-C18-Kieselgel gefüllt wird, zugegeben und mit 0% ~ 40% MeOH in H₂O eluiert. Die Produkt-Fractionen werden gesammelt, im Vakuum eingengt und wieder in wenigem H₂O gelöst und lyophilisiert.

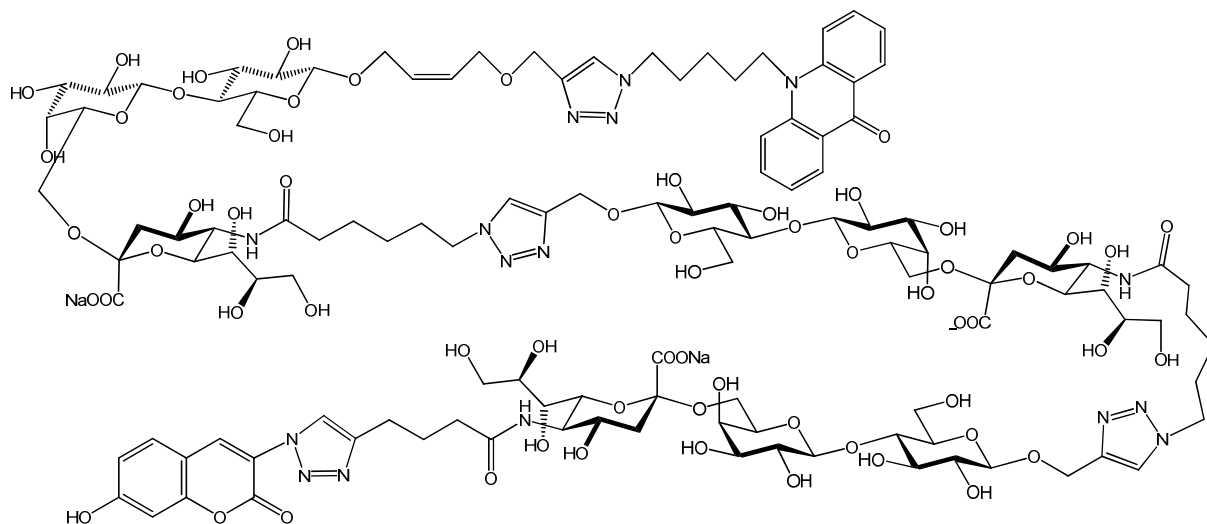
$R_f = 0.39$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23) für Produkt **259a**

$R_f = 0.19$ (n-BuOH/Aceton/AcOH/H₂O = 35:35:7:23) für Produkt **259b**

Et₂NCoum-Sia- α -2,6-Lac-CH₂-T-L-Sia- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr (259a)



Et₂NCoum-L-Sia-(α -2,6-Lac-CH₂-T-L-Sia)₂- α -2,6-Lac-D-T-P-Acr (259b)



Madi-MS: Produkt **259a**: C₉₅H₁₂₉N₁₃Na₃O₄₂ [M+Na]⁺: berechnet 2193.8, gemessen 2194.8;

Produkt **259b**: C₁₂₅H₁₇₆N₁₇Na₄O₆₁ [M+Na]⁺: berechnet 2984.08, gemessen 2985.3

6. Literaturverzeichnis

- [1] R. Schauer "Achievements and challenges of sialic acid research" *Glycoconj. J.*, **2000**, 17, 485-499.
- [2] G. Blix "The carbohydrate groups of the submaxillary mucin" *Z. physiol. Chem.*, **1936**, 240, 43-54.
- [3] G. Blix, L. Svennerholm, I. Werner "The isolation of chondrosamine from gangliosides and from submaxillary mucin" *Acta Chem. Scand.*, **1952**, 6, 358-62.
- [4] E. Klenk "Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids" *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, **1941**, 268, 50-58.
- [5] J.-P. Zanetta, A. Pons, M. Iwersen, C. Mariller, Y. Leroy, P. Timmerman, R. Schauer "Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives" *Glycobiology*, **2001**, 11, 663-676.
- [6] C. Robbe, C. Capon, E. Maes, M. Rousset, A. Zweibaum, J.-P. Zanetta, J.-C. Michalski "Evidence of Regio-specific Glycosylation in Human Intestinal Mucins" *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 46337-46348.
- [7] Sadako Inoue, Ken Kitajima, Y. Inoue "Identification of 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonononic acid (KDN, Deaminoneuraminic Acid) Residues in Mammalian Tissues and Human Lung Carcinoma Cells" *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 24341-24344.
- [8] T. Angata, A. Varki "Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective" *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 439-469.
- [9] G. Blix, E. Lindberg, L. Odin, I. Werner "Sialic acids" *Nature (London, U. K.)*, **1955**, 175, 340-1.
- [10] R. Schauer "Chemistry, Metabolism, and Biological Functions of Sialic Acids" *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1982**, 40, 131-234.
- [11] D. Nadano, M. Iwasaki, S. Endo, K. Kitajima, S. Inoue, Y. Inoue "A Naturally Occurring Deaminated Neuraminic Acid, 3-Deoxy-D-glycero-D-galactononulosonic Acid (KDN)" *J. Biol. Chem.*, **1986**, 261, 11550-11557.
- [12] S. Inoue, K. Kitajima, Y. Inoue "Identification of 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonononic acid (KDN, Deaminoneuraminic Acid) Residues in Mammalian Tissues and Human Lung Carcinoma Cells" *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 24341-24344.
- [13] G. Blix, E. Lindberg, L. Odin, I. Werner "Sialic acids" *Acta Soc. Med. Ups.*, **1956**, 61, 1-24.
- [14] A. Varki "N-glycolylneuraminic acid deficiency in humans" *Biochemie*, **2001**, 83, 615-622.

-
- [15] M.v. Elstermann, *Alternative Wege einer endogenen Biosynthese der N-Glycolylneuraminsäure in menschlichen Mammakarzinomzellen*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät* 2006, Universität zu Köln Köln.
- [16] H. Higashi, Y. Hirabayashi, Y. Fukui, M. Naiki, M. Matsumoto, S. Ueda, S. Kato "Characterization of N-Glycolylneuraminic Acid-containing Gangliosides as Tumor-associated Hanganutziu-Deicher Antigen in Human Colon Cancer" *Cancer Res.*, **1985**, 45, 3796.
- [17] G. Marquina, H. Waki, L.E. Fernandez, K. Kon, A. Carr, O. Valiente, R. Perez, S. Ando "Gangliosides Expressed in Human Breast Cancer" *Cancer Res.*, **1996**, 56, 5165-5171.
- [18] C. Butor, S. Diaz, A. Varki "High level O-acetylation of sialic acids on N-linked oligosaccharides of rat liver membranes. Differential subcellular distribution of 7- and 9-O-acetyl groups and of enzymes involved in their regulation. " *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 10197-10206.
- [19] C. Traving, R. Schauer "Structure, function and metabolism of sialic acids" *Cellular and Molecular Life Sciences*, **1998**, 54, 1330-1349.
- [20] W.F. Vann, T.Y. Liu, J.B. Robbins "Cell-free biosynthesis of the O-acetylated N-acetylneuraminic acid capsular polysaccharide of group C meningococci" *J. Bacteriol.*, **1978**, 133, 1300-1306.
- [21] H.H. Higa, C. Butor, S. Diaz, A. Varki "O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. O-acetylation of sialic acids in the rat liver Golgi apparatus involves an acetyl intermediate and essential histidine and lysine residues--a transmembrane reaction? " *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 19427-19434.
- [22] A.K. Shukla, C. Schröder, U. Nöhle, R. Schauer "Natural Occurrence and Preparation of O-Acylated 2,3-Unsaturated Sialic Acids" *Carbohydr. Res.*, **1987**, 168, 199-209.
- [23] A. Varki, R. Schauer, *Sialic Acids*, in *Essentials of Glycobiology, 2th Edition*, A. Varki, et al., Editors. 2009, Cold Spring Harbor Laboratory: New York.
- [24] J.F.G. Vliegthart "High resolution proton NMR spectroscopy of carbohydrate structures" *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1980**, 125, 77-91.
- [25] J. Haverkamp, H. Van Halbeek, L. Dorland, J.F.G. Vliegthart, R. Pfeil, R. Schauer "High-resolution proton NMR spectroscopy of free and glycosidically linked O-acetylated sialic acids" *Eur. J. Biochem.*, **1982**, 122, 305-11.
- [26] S. Tsuji, A.K. Datta, J.C. Paulson "Symposium on structure, function and evolution of glycoproteins and related molecules" *Glycobiology*, **1996**, 6, V-VII.
- [27] M. Iwasaki, S. Inoue, K. Kitajima, H. Nomoto, Y. Inoue "Novel oligosaccharide chains on polysialoglycoproteins isolated from rainbow trout eggs. A unique carbohydrate

- sequence with a sialidase-resistant sialyl group, DGalNAc.beta.1 .fwdarw. 4(NeuGc2 .fwdarw. 3)DGalNAc" *Biochemistry*, **1984**, 23, 305-310.
- [28] G. Muralikrishna, G. Reuter, J. Peter-Katalinić, H. Egge, F.-G. Hanisch, H.-C. Siebert, R. Schauer "Identification of a new ganglioside from the starfish *Asterias rubens*" *Carbohydr. Res.*, **1992**, 236, 321-326.
- [29] E.D. Green, G. Adelt, J.U. Baenziger, S. Wilson, H.V. Halbeek "The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz ¹H NMR spectroscopy" *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 18253-18268.
- [30] A. Slomiany, B.L. Slomiany "The sugar chains of cold-insoluble globulin. A protein related to fibronectin" *J. Biol. Chem.*, **1978**, 253, 7301-7306.
- [31] S. Takasaki, K. Yamashita, K. Suzuki, S. Iwanaga, A. Kobata "The sugar chains of cold-insoluble globulin. A protein related to fibronectin" *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 8548-8553.
- [32] M.N. Fukuda, A. Dell, J.E. Oates, M. Fukuda "Embryonal lactosaminoglycan. The structure of branched lactosaminoglycans with novel disialosyl (sialyl alpha 2-9 sialyl) terminals isolated from PA1 human embryonal carcinoma cells" *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 6623-6631.
- [33] E.V. Vinogradov, N.A. Paramonov, Y.A. Knirel, A.S. Shashkov, N.K. Kochetkov "Structural study of a new sialic acid-containing O-specific polysaccharide of *Salmonella arizonae* O21; formation of anhydro derivatives of neuraminic acid upon treatment with anhydrous hydrogen fluoride" *Carbohydr. Res.*, **1993**, 242, C11-C14.
- [34] A.M. Gil-Serrano, M.A. Rodríguez-Carvajal, P. Tejero-Mateo, J.L. Espartero, J. Thomas-Oates, J.E. Ruiz-Sainz, A.M. Buendía-Clavería "Structural determination of a 5-O-methyl-deaminated neuraminic acid (Kdn)-containing polysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii*" *J. Biochem.*, **1998**, 334, 585-594.
- [35] A. Bardotti, G. Averani, F. Berti, S. Berti, C. Galli, S. Giannini, B. Fabbri, D. Proietti, N. Ravenscroft, S. Ricci "Size determination of bacterial capsular oligosaccharides used to prepare conjugate vaccines against *Neisseria meningitidis* groups Y and W135" *Vaccine*, **2005**, 23, 1887-2021.
- [36] F. Ahmad, P. McPhie "The intrinsic viscosity of glycoproteins" *Int. J. Biochem.*, **1980**, 11, 91-187.
- [37] R. Schauer "Sialic acids and their role as biological masks" *Trends in Biochemical Sciences*, **1985**, 10, 357-360.

-
- [38] R. Schauer "Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2009**, *19*, 507-514.
- [39] U. Rutishauser "Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system " *Nat. Rev. Neurosci.*, **2008**, *9*, 26-35.
- [40] F. Lehmann, E. Tiralongo, J. Tiralongo "Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function" *Cell Mol. Life Sci.*, **2006**, *63*, 1331-1354.
- [41] A. Varki, T. Angata "Siglecs—the major subfamily of I-type lectins " *Glycobiology*, **2006**, *16*, 1R-27R.
- [42] A.F. Carlin, A.L. Lewis, A. Varki, V. Nizet "Group B Streptococcal Capsular Sialic Acids Interact with Siglecs (Immunoglobulin-Like Lectins) on Human Leukocytes" *J. Bacteriol.*, **2007**, *189*, 1231-1237.
- [43] H.H.M. Abdu-Allah, T. Tamanaka, J. Yu, L. Zhuoyuan, M. Sadagopan, T. Adachi, T. Tsubata, S. Kelm, H. Ishida, M. Kiso "Design, Synthesis, and Structure-Affinity Relationships of Novel Series of Sialosides as CD22-Specific Inhibitors" *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 6665-6681.
- [44] M.D. Chappell, R.L. Halcomb "Enzyme-Catalyzed Synthesis of Oligosaccharides That Contain Functionalized Sialic Acids" *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 3393-3394.
- [45] C. De Meo, U. Priyadarshani "C-5 Modifications in N-acetyl-neuraminic acid: scope and limitations" *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343*, 1540-1552.
- [46] H. Ando, Y. Koike, H. Ishida, M. Kiso "Extending the possibility of an N-Troc-protected sialic acid donor toward variant sialo-glycoside synthesis" *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 6883-6886.
- [47] D. Crich, B. Wu "Stereoselective Iterative One-Pot Synthesis of N-Glycolylneuraminic Acid-Containing Oligosaccharides" *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 4033-4035.
- [48] S. Hanashima, T. Tomiya, D. Ishikawa, S. Akai, K.-i. Sato "Sialylation using N-glycolylneuraminyl phosphite donors to synthesize Neu5Gc-containing glycans " *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 959-965.
- [49] N. Laurent, J. Voglmeir, S.L. Flitsch "Glycoarrays—tools for determining protein - carbohydrate interactions and glycoenzyme specificity" *Chem. Commun.* , **2008**, 4400-4412.
- [50] J. Stevens, O. Blixt, J.C. Paulson, I.A. Wilson "Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses" *Nat. Rev. Microbiol.*, **2006**, *4*, 857-864.
- [51] D. Wang, S. Liu, B.J. Trummer, C. Deng, A. Wang "Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells " *Nat. Biotechnol.*, **2002**, *20*, 275-281.

-
- [52] S. Mehta, M. Gilbert, W.W. Wakarchuk, D.M. Whitfield "Ready Access to Sialylated Oligosaccharide Donors" *Org. Lett.*, **2000**, 2, 751-753.
- [53] M. Hayashi, M. Tanaka, M. Itoh, H. Miyauchi "A Convenient and Efficient Synthesis of SLeX Analogs" *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 2938-45.
- [54] H. Cao, S. Huang, J. Cheng, Y. Li, S. Muthana, B. Son, X. Chen "Chemical preparation of sialyl Lewis x using an enzymatically synthesized sialoside building block" *Carbohydr. Res.*, **2008**, 343, 2863-2869.
- [55] Y. Ito, J.C. Paulson "A novel strategy for synthesis of ganglioside GM3 using an enzymically produced sialoside glycosyl donor" *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 1603-1605.
- [56] J. Hao, W.F. Vann, S. Hinderlich, M. Sundaramoorthy "Elimination of 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid 9-phosphate synthase activity from human N-acetylneuraminic acid 9-phosphate synthase by a single mutation" *Biochem. J.*, **2006**, 397, 195-201.
- [57] S.M. Lawrence, K.A. Huddleston, L.R. Pitts, N. Nguyen, Y.C. Lee, W.F. Vann, T.A. Coleman, M.J. Betenbaugh "Cloning and expression of the human N-acetylneuraminic acid phosphate synthase gene with 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid biosynthetic ability" *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 17869-17877.
- [58] M.E. Tanner "The enzymes of sialic acid biosynthesis" *Bioorg. Chem.*, **2005**, 33, 216-228.
- [59] A.S. Murkin, W.K. Chou, W.W. Wakarchuk, M.E. Tanner "Identification and Mechanism of a Bacterial Hydrolyzing UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase" *Biochemistry*, **2004**, 43, 14290-14298.
- [60] W.F. Vann, D.A. Daines, A.S. Murkin, M.E. Tanner, D.O. Chaffin, C.E. Rubens, J. Vionnet, R.P. Silver "The NeuC protein of Escherichia coli K1 is a UDP N-acetylglucosamine 2-epimerase" *J. Bacteriol.*, **2004**, 186, 706-712.
- [61] R.S. Blacklow, L. Warren "Biosynthesis of sialic acids by Neisseria meningitidis" *J Biol Chem*, **1962**, 237, 3520-6.
- [62] J. Gunawan, D. Simard, M. Gilbert, A.L. Lovering, W.W. Wakarchuk, M.E. Tanner, N.C.J. Strynadka "Structural and Mechanistic Analysis of Sialic Acid Synthase NeuB from *Neisseria meningitidis* in Complex with Mn^{2+} , Phosphoenolpyruvate, and N-Acetylmannosaminitol" *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 3555-3563.
- [63] P.W. Annunziato, L.F. Wright, W.F. Vann, R.P. Silver "Nucleotide sequence and genetic analysis of the neuD and neuB genes in region 2 of the polysialic acid gene cluster of Escherichia coli K1" *J. Bacteriol.*, **1995**, 177, 312-19.

-
- [64] A.K. Sundaram, L. Pitts, K. Muhammad, J. Wu, M. Betenbaugh, R.W. Woodard, W.F. Vann "Characterization of N-acetylneuraminic acid synthase isoenzyme 1 from *Campylobacter jejuni*" *Biochem. J.*, **2004**, 383, 83-89.
- [65] V. Suryanti, A. Nelson, A. Berry "Cloning, over-expression, purification, and characterisation of N-acetylneuraminate synthase from *Streptococcus agalactiae*" *Protein Expression and Purification*, **2003**, 27, 346-356.
- [66] E.R. Vimr, W. Aaronson, R.P. Silver "Genetic analysis of chromosomal mutations in the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1" *J. Bacteriol.*, **1989**, 171, 1106-1117.
- [67] F. Liu, H.J. Lee, N.C.J. Strynadka, M.E. Tanner "Inhibition of *Neisseria meningitidis* sialic acid synthase by a tetrahedral intermediate analog" *Biochemistry*, **2009**, 48, 9194-9201.
- [68] M. Knorst, *Neue Enzyme zur Synthese von Sialinsäurehaltigen Oligosacchariden*, in *RWTH Aachen*. 1999: Aachen.
- [69] P. Unruh, "Chemo-enzymatische Synthese neuartiger Sialokonjugate". 2007, Dissertation, Technische Universität Darmstadt: Darmstadt.
- [70] C.-H. Wong, G.M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, ed. C.-H. Wong and G.M. Whitesides. 1994, Elsevier, Oxford.
- [71] S. Huang, H. Yu, X. Chen "Disaccharides as Sialic Acid Aldolase Substrates: Synthesis of Disaccharides Containing a sialic Acid at the Reducing End" *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2007**, 46, 2249-2253.
- [72] K. Aisaka, A. Igarashi, K. Yamaguchi, T. Uwajima "Purification, crystallization and characterization of N-acetylneuraminate lyase from *Escherichia coli*" *Biochem. J.*, **1991**, 276, 541-546.
- [73] E.R. Vimr, F.A. Troy "Regulation of sialic acid metabolism in *Escherichia coli*: role of N-acetylneuraminate pyruvate-lyase" *J. Bacteriol.*, **1985**, 164, 854-60.
- [74] C. Traving, P. Roggentin, R. Schauer "Cloning, sequencing and expression of the acylneuraminate lyase gene from *Clostridium perfringens* A99" *Glycoconjugate J.*, **1997**, 14, 821-830.
- [75] F.N. Kolisis "An immobilized bienzyme system for assay of sialic acid" *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1986**, 8, 148-52.
- [76] K. Aisaka, T. Uwajima "Cloning and constitutive expression of the N-acetylneuraminate lyase gene of *Escherichia coli*" *Appl. Environ. Microbiol.*, **1986**, 51, 562-565.
- [77] Y. Ohta, M. Shimosaka, K. Murata, Y. Tsukada, A. Kimura "Molecular cloning of the N-acetylneuraminate lyase gene in *Escherichia coli* K-12" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1986**, 24, 386-391.

-
- [78] H. Yu, H. Yu, R. Karpel, X. Chen "Chemoenzymatic synthesis of CMP-sialic acid derivatives by a one-pot two-enzyme system: comparison of substrate flexibility of three microbial CMP-sialic acid synthetases" *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 6427-6435.
- [79] G.G. Lilley, J.A.R.G. Barbosa, L.A. Pearce "Expression in *Escherichia coli* of the Putative N-Acetylneuraminate Lyase Gene (nanA) from *Haemophilus influenzae*: Overproduction, Purification, and Crystallization " *Protein Expression Purif.*, **1998**, 12, 295-304.
- [80] K.C. Meysick, K. Dimock, G.E. Garber "Molecular characterization and expression of a N-acetylneuraminate lyase gene from *Trichomonas vaginalis*" *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1996**, 76, 289-292.
- [81] Y. Li, H. Yu, H. Cao, K. Lau, S. Muthana, V.K. Tiwari, B. Son, X. Chen "*Pasteurella multocida* sialic acid aldolase: a promising biocatalyst" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, 79, 963-970.
- [82] H. Yu, S. Huang, H. Chokhawala, M. Sun, H. Zheng, X. Chen "Highly efficient chemoenzymatic synthesis of naturally occurring and non-natural alpha -2,6-linked sialosides: a P. damsela alpha -2,6-sialyltransferase with extremely flexible donor-substrate specificity" *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006**, 45, 3938-3944.
- [83] H. Yu, X. Chen "Aldolase-Catalyzed Synthesis of β -D-Galp-(1->9)-D-KDN: A Novel Acceptor for Sialyltransferases" *Org. Lett.*, **2006**, 8, 2393-2396.
- [84] D.G. Comb, S. Roseman "Sialic acids. I. Structure and enzymic synthesis of N-acetylneuraminic acid" *J. Biol. Chem.*, **1960**, 235, 2529-37.
- [85] M.J. Kim, W.J. Hennen, H.M. Sweers, C.H. Wong "Enzymes in carbohydrate synthesis: N-acetylneuraminic acid aldolase catalyzed reactions and preparation of N-acetyl-2-deoxy-D-neuraminic acid derivatives" *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 6481-6486.
- [86] C.H. Lin, T. Sugai, R.L. Halcomb, Y. Ichikawa, C.H. Wong "Unusual stereoselectivity in sialic acid aldolase-catalyzed aldol condensations: synthesis of both enantiomers of high-carbon monosaccharides" *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10138-45.
- [87] L. Warren, R.S. Blacklow "The Biosynthesis of Cytidine 5'-Monophospho-N-acetylneuraminic Acid by an Enzyme from *Nesseria meningitidis*" *J. Biol. Chem.*, **1962**, 237, 3527-3534.
- [88] M.G. Ambrose, S.J. Freese, M.S. Reinhold, T.G. Warner, W.F. Vann "¹³C NMR investigation of the anomeric specificity of CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase from *Escherichia coli*" *Biochemistry*, **1992**, 31, 775-80.
- [89] N.M. Samuels, B.W. Gibson, S.M. Miller "Investigation of the Kinetic Mechanism of Cytidine 5'-Monophosphate N-Acetylneuraminic Acid Synthetase from *Haemophilus*

-
- ducreyi* with New Insights on Rate-Limiting Steps from Product Inhibition Analysis" *Biochemistry*, **1999**, 38, 6195-6203.
- [90] I.G. Bravo, S. García-Vallvé, A. Romeu, Á. Reglero "Prokaryotic origin of cytidylyltransferases and α -ketoacid synthases" *Trends Microbiol.*, **2004**, 12, 120-128.
- [91] H.H. Higa, J.C. Paulson "Sialylation of glycoprotein oligosaccharides with N-acetyl-, N-glycolyl-, and N-O-diacetylneuraminic acids" *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 8838-48.
- [92] T. Terada, S. Kitazume, K. Kitajima, S. Inoue, F. Ito, F.A. Troy, Y. Inoue "Synthesis of CMP-deaminoneuraminic acid (CMP-KDN) using the CTP: CMP-3-deoxynonulosonate cytidylyltransferase from rainbow trout testis. Identification and characterization of a CMP-KDN synthetase" *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 2640-8.
- [93] A.K. Münster-Kühnel, B. Weinhold, B. Gotza, M. Muhlenhoff, M. Frosch, R. Gerardy-Schahn "Nuclear localization signal of murine CMP-Neu5Ac synthetase includes residues required for both nuclear targeting and enzymatic activity" *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 19688-19696.
- [94] A.K. Münster-Kühnel, J. Tiralongo, S. Krapp, B. Weinhold, V. Ritz-Sedlacek, U. Jacob, R. Gerardy-Schahn "Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases" *Glycobiology*, **2004**, 14, 43R-51R.
- [95] R.M. Mizanur, N.L. Pohl "Bacterial CMP-sialic acid synthetases: production, properties, and applications" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, 80, 757-765.
- [96] R.M. Mizanur, N.L. Pohl "Cloning and characterization of a heat-stable CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase from *Clostridium thermocellum*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, 76, 827-834.
- [97] H. Kajiwarra, T. Mine, T. Miyazaki, T. Yamamoto "A CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase purified from a marine bacterium, *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145" *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **2011**, 75, 47-53.
- [98] W.F. Vann, R.P. Silver, C. Abeijon, K. Chang, W. Aaronson, A. Sutton, C.W. Finn, W. Lindner, M. Kotsatos "Purification, properties, and genetic location of *Escherichia coli* cytidine 5-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase" *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262, 17556-62.
- [99] R.F. Haft, M.R. Wessels "Characterization of CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase of group B streptococci" *J Bacteriol*, **1994**, 176, 7372-4.
- [100] M.V. Tullius, R.S. Munson, Jr., J. Wang, B.W. Gibson "Purification, cloning, and expression of a cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase from *Haemophilus ducreyi*" *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 15373-15380.

-
- [101] I.G. Bravo, S. Barrallo, M.A. Ferrero, L.B. Rodríguez-Aparicio, H. Martínez-Blanco, Á. Reglero "Kinetic properties of the acylneuraminate cytidyltransferase from *Pasteurella haemolytica* A2" *Biochem. J.*, **2001**, 358, 585-598.
- [102] M. Gilbert, R. Bayer, A.-M. Cunningham, S. DeFrees, Y. Gao, D.C. Watson, N.M. Young, W.W. Wakarchuk "The synthesis of sialylated oligosaccharides using a CMP-Neu5Ac synthetase/sialyltransferase fusion" *Nat. Biotechnol.*, **1998**, 16, 769-772.
- [103] J. Rauvolfova, A. Venot, G.-J. Boons "Chemo-enzymatic synthesis of C-9 acetylated sialosides" *Carbohydr. Res.*, **2008**, 343, 1605-1611.
- [104] M. Knorst, W.-D. Fessner "CMP-sialate synthetase from *Neisseria meningitidis* - overexpression and application to the synthesis of oligosaccharides containing modified sialic acids" *Adv. Synth. Catal.*, **2001**, 343, 698-710.
- [105] S. Jelakovic, K. Jann, G.E. Schulz "The three-dimensional structure of capsule-specific CMP: 2-keto-3-deoxy-manno-octonic acid synthetase from *Escherichia coli*" *FEBS Lett.*, **1996**, 391, 157-61.
- [106] S. Jelakovic, G.E. Schulz "The structure of CMP:2-keto-3-deoxy-manno-octonic acid synthetase and of its complexes with substrates and substrate analogs" *J Mol Biol.*, **2001**, 312, 143-55.
- [107] S. Krapp, A.K. Munster-Kuehnel, J.T. Kaiser, R. Huber, J. Tiralongo, R. Gerardy-Schahn, U. Jacob "The Crystal Structure of Murine CMP-5-N-acetylneuraminic Acid Synthetase" *J. Mol. Biol.*, **2003**, 334, 625-637.
- [108] S.C. Mosimann, M. Gilbert, D. Dombrowski, R. To, W. Wakarchuk, N.C.J. Strynadka "Structure of a sialic acid-activating synthetase, CMP-acylneuraminate synthetase in the presence and absence of CDP" *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 8190-8196.
- [109] C. Unverzagt, H. Kunz, J.C. Paulson "High-efficiency synthesis of sialyloligosaccharides and sialoglycopeptides" *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 113, 9308-9309.
- [110] J.L.C. Liu, G.J. Shen, Y. Ichikawa, J.F. Rutan, G. Zapata, W.F. Vann, C.H. Wong "Overproduction of CMP-sialic acid synthetase for organic synthesis" *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3901-10.
- [111] E.L. Kean "Sialic acid activation" *Glycobiology*, **1991**, 1, 441-7.
- [112] T. Yamamoto, Y. Takakura, H. Tsukamoto "Bacterial Sialyltransferases" *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **2006**, 18, 253-265.
- [113] K. Sujino, R.J. Jackson, N.W.C. Chan, S. Tsuji, M.M. Palcic "A novel viral alpha 2,3-sialyltransferase (v-ST3Gal I): transfer of sialic acid to fucosylated acceptors" *Glycobiology*, **2000**, 10, 313-320.

-
- [114] A. Harduin-Lepers, D.C. Stokes, W.F. Steelant, B. Samyn-Petit, M.A. Krzewinski-Recchi, V. Vallejo-Ruiz, J.P. Zanetta, C. Auge, P. Delannoy "Cloning, expression and gene organization of a human Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 2,6-sialyltransferase: hST6GalNAcIV" *Biochem J*, **2000**, 352 Pt 1, 37-48.
- [115] A. Harduin-Lepers "Comprehensive analysis of sialyltransferases in vertebrate genomes" *Glycobiol. Insights*, **2010**, 2, 29-61.
- [116] M. Izumi, C.-H. Wong "Microbial Sialyltransferases for Carbohydrate Synthesis" *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **2001**, 13, 345-360.
- [117] P.M. Coutinho, E. Deleury, G.J. Davies, B. Henrissat "An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases" *J. Mol. Biol.*, **2003**, 328, 307-317.
- [118] T. Yamamoto "Marine bacterial sialyltransferases" *Mar. Drugs*, **2010**, 8, 2781-2794.
- [119] S.M. Steenbergen, E.R. Vimr "Functional Relationships of the Sialyltransferases Involved in Expression of the Polysialic Acid Capsules of Escherichia coli K1 and K92 and Neisseria meningitidis Groups B or C" *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 15349-15359.
- [120] G.-J. Shen, A.K. Datta, M. Izumi, K.M. Koeller, C.-H. Wong "Expression of α 2,8/2,9-Polysialyltransferase from Escherichia coli K92: Characterization of the Enzyme and its Reaction Products" *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 35139-35146.
- [121] F. Freiburger, H. Claus, A. Guenzel, I. Oltmann-Norden, J. Vionnet, M. Muehlenhoff, U. Vogel, W.F. Vann, R. Gerardy-Schahn, K. Stummeyer "Biochemical characterization of a Neisseria meningitidis polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases" *Mol. Microbiol.*, **2007**, 65, 1258-1275.
- [122] M. Gilbert, J.-R. Brisson, M.-F. Karwaski, J. Michniewicz, A.-M. Cunningham, Y. Wu, N.M. Young, W.W. Wakarchuk "Biosynthesis of ganglioside mimics in Campylobacter jejuni OH4384. Identification of the glycosyltransferase genes, enzymatic synthesis of model compounds, and characterization of nanomole amounts by 600-MHz H and C NMR analysis" *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 3896-3906.
- [123] D.W. Hood, A.D. Cox, M. Gilbert, K. Makepeace, S. Walsh, M.E. Deadman, A. Cody, A. Martin, M. Månsson, E.K.H. Schweda, J.-R. Brisson, J.C. Richards, E.R. Moxon, W.W. Wakarchuk "You have full text access to this OnlineOpen article Identification of a lipopolysaccharide α -2,3-sialyltransferase from *Haemophilus influenzae*" *Mol. Microbiol.*, **2001**, 39, 341-350.
- [124] M. Gilbert, D.C. Watson, A.-M. Cunningham, M.P. Jennings, N.M. Young, W.W. Wakarchuk "Cloning of the Lipooligosaccharide α -2,3-Sialyltransferase from the Bacterial Pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*" *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 28271-28276.

-
- [125] T. Yamamoto, M. Nakashizuka, I. Terada "Cloning and expression of a marine bacterial beta -galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene from *Photobacterium damsela* JT0160" *J. Biochem.*, **1998**, *123*, 94-100.
- [126] H. Yu, H. Chokhawala, R. Karpel, H. Yu, B. Wu, J. Zhang, Y. Zhang, Q. Jia, X. Chen "A Multifunctional *Pasteurella multocida* Sialyltransferase: A Powerful Tool for the Synthesis of Sialoside Libraries" *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17618-17619.
- [127] C.P.C. Chiu, A.G. Watts, L.L. Lairson, M. Gilbert, D. Lim, W.W. Wakarchuk, S.G. Withers, N.C.J. Strynadka "Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog" *nature structural & molecular biology*, **2004**, *11*, 163-170.
- [128] L. Ni, M. Sun, H. Yu, H. Chokhawala, X. Chen, A.J. Fisher "Cytidine 5'-Monophosphate (CMP)-Induced Structural Changes in a Multifunctional Sialyltransferase from *Pasteurella multocida*" *Biochemistry*, **2006**, *45*, 2139-2148.
- [129] D.-U. Kim, J.-H. Yoo, Y.J. Lee, K.S. Kim, H.-S. Cho "Structural analysis of sialyltransferase PM0188 from *Pasteurella multocida* complexed with donor analogue and acceptor sugar" *BMB Rep.*, **2008**, *41*, 48-54.
- [130] C.P.C. Chiu, L.L. Lairson, M. Gilbert, W.W. Wakarchuk, S.G. Withers, N.C.J. Strynadka "Structural Analysis of the α -2,3-Sialyltransferase Cst-I from *Campylobacter jejuni* in Apo and Substrate-Analogue Bound Forms" *Biochemistry*, **2007**, *46*, 7196-7204.
- [131] T. Iwatania, N. Okinob, M. Sakakurac, H. Kajiwarad, Y. Takakurad, M. Kimuraa, M. Itob, T. Yamamoto "Crystal structure of α / β -galactoside α 2,3-sialyltransferase from a luminous marine bacterium, *Photobacterium phosphoreum*" *FEBS Lett.*, **2009**, *583*, 2083-2087.
- [132] Y. Kakuta, N. Okino, H. Kajiwara, M. Ichikawa, Y. Takakura, M. Ito, T. Yamamoto "Crystal structure of Vibrionaceae *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 alpha 2,6-Sialyltransferase in a ternary complex with donor product CMP and acceptor substrate lactose: Catalytic mechanism and substrate recognition" *Glycobiology*, **2008**, *18*, 66-73.
- [133] F.V. Rao, J.R. Rich, B. Rakic, S. Buddai, M.F. Schwartz, K. Johnson, C. Bowe, W.W. Wakarchuk, S. DeFrees, S.G. Withers, N.C.J. Strynadka "Structural insight into mammalian sialyltransferases" *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2009**, *16*, 1186-1188.
- [134] T. Mine, H. Kajiwara, T. Murase, Y. Kajihara, T. Yamamoto "An α 2,3-Sialyltransferase from *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 Transfers N-Acetylneuraminic Acid to Both the O-2 and O-3' Hydroxyl Groups of Lactose" *J. Carbohydr. Chem.*, **2010**, *29*, 51-60.

-
- [135] T. Mine, T. Miyazaki, H. Kajiwar, K. Naito, K. Ajisaka, T. Yamamoto "Enzymatic synthesis of unique sialyloligosaccharides using marine bacterial α -(2 \rightarrow 3)- and α -(2 \rightarrow 6)-sialyltransferases" *Carbohydr. Res.*, **2010**, 345, 1417-1421.
- [136] T. Mine, T. Miyazaki, H. Kajiwar, N. Tateda, K. Ajisaka, T. Yamamoto "A recombinant α -(2 \rightarrow 3)-sialyltransferase with an extremely broad acceptor substrate specificity from *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 can transfer N-acetylneuraminic acid to inositols" *Carbohydr. Res.*, **2010**, 345, 2485-2490.
- [137] S. Drouillard, T. Mine, H. Kajiwar, T. Yamamoto, E. Samain "Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered *E. coli* expressing a multifunctional sialyltransferase from the *Photobacterium* sp. JT-ISH-224" *Carbohydr. Res.*, **2010**, 345, 1394-1399.
- [138] T. Yamamoto, Y. Hamada, M. Ichikawa, H. Kajiwar, T. Mine, H. Tsukamoto, Y. Takakura "A β -galactoside α 2,6-sialyltransferase produced by a marine bacterium, *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145, is active at pH 8" *Glycobiology*, **2007**, 17, 1167-1174.
- [139] M. Sun, Y. Li, H.A. Chokhawala, R. Henning, X. Chen "N-Terminal 112 amino acid residues are not required for the sialyltransferase activity of *Photobacterium damsela* α -2,6-sialyltransferase" *Biotechnol. Lett.*, **2008**, 30, 671-676.
- [140] H.A. Chokhawala, H. Yu, X. Chen "High-throughput substrate specificity studies of sialidases by using chemoenzymatically synthesized sialoside libraries" *ChemBioChem*, **2007**, 8, 194-201.
- [141] S.S. Huang, H. Yu, X. Chen "Chemo-enzymic synthesis of α 2-3-sialylated carbohydrate epitopes" *Sci. China Chem.*, **2011**, 54, 117-128.
- [142] O. Blixt, D. Vasiliu, K. Allin, N. Jacobsen, D. Warnock, N. Razi, J.C. Paulson, S.p. Bernatchez, M. Gilbert, W. Wakarchuk "Chemoenzymatic synthesis of 2-azidoethyl-ganglio-oligosaccharides GD3, GT3, GM2, GD2, GT2, GM1, and GD1a" *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340, 1963-1972.
- [143] Z. Wang, M. Gilbert, H. Eguchi, H. Yu, J. Cheng, S. Muthana, L. Zhou, P.G. Wang, X. Chen, X. Huang "Chemoenzymatic syntheses of tumor-associated carbohydrate antigen globo-H and stage-specific embryonic antigen 4" *Adv. Synth. Catal.*, **2008**, 350, 1717-1728.
- [144] N. Fierfort, E. Samain "Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides" *J. Biotechnol.*, **2008**, 134, 261-265.

-
- [145] H. Cao, S. Muthana, Y. Li, J. Cheng, X. Chen "Parallel chemoenzymatic synthesis of sialosides containing a C5-diversified sialic acid" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 5869-5871.
- [146] H. Yu, J. Cheng, L. Ding, Z. Khedri, Y. Chen, S. Chin, K. Lau, V.K. Tiwari, X. Chen "Chemoenzymatic Synthesis of GD3 Oligosaccharides and Other Disialyl Glycans Containing Natural and Non-natural Sialic Acids" *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 18467-18477.
- [147] K. Lau, H. Yu, V. Thon, Z. Khedri, M.E. Leon, B.K. Tran, X. Chen "Sequential two-step multi-enzyme synthesis of tumor-associated sialyl T-antigens and derivatives" *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 2784-2789.
- [148] P.R. Crocker, A. Varki "Siglecs, sialic acids and innate immunity" *Trends Immunol.*, **2001**, *22*, 337-342.
- [149] Y. Suzuki "Sialobiology of Influenza: Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses" *Biol. Pharm. Bull.*, **2005**, *28*, 399-408.
- [150] C.L. Jacobs, S. Goon, K.J. Yarema, S. Hinderlich, H.C. Hang, D.H. Chai, C.R. Bertozzi "Substrate Specificity of the Sialic Acid Biosynthetic Pathway" *Biochemistry*, **2001**, *40*, 12864-12874.
- [151] H. Kayser, R. Zeitler, C. Kannicht, D. Grunow, R. Nuck, W. Reutter "Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using *N*-propanoyl-D-hexosamines as precursors." *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 16934-16938.
- [152] C. Oetke, R. Brossmer, L.R. Mantey, S. Hinderlich, R. Isecke, W. Reutter, O.T. Keppler, M. Pawlita "Versatile biosynthetic engineering of sialic acid in living cells using synthetic sialic acid analogues" *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 6688-6695.
- [153] L.R. Mantey, O.T. Keppler, M. Pawlita, W. Reutter, S. Hinderlich "Efficient biochemical engineering of cellular sialic acids using an unphysiological sialic acid precursor in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase" *FEBS Lett.*, **2001**, *503*, 80-84.
- [154] J.H. Lee, T.J. Baker, L.K. Mahal, J. Zabner, C.R. Bertozzi, D.F. Wiemer, M.J. Welsh "Engineering Novel Cell Surface Receptors for Virus-mediated Gene Transfer " *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 21878-21884.
- [155] S.J. Luchansky, C.R. Bertozzi "Azido sialic acids can modulate cell-surface interactions" *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 1706-1709.
- [156] P.V. Chang, X. Chen, C. Smyrniotis, A. Xenakis, T. Hu, C.R. Bertozzi, P. Wu "Metabolic Labeling of Sialic Acids in Living Animals with Alkynyl Sugars" *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48*, 4030-4033, S4030/1-S4030/26.

-
- [157] O.T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidt, W. Reutter "Biochemical engineering of the *N*-acyl side chain of sialic acid: biological implications " *Glycobiology*, **2001**, *11*, 11R-18R.
- [158] W. König, R. Geiger "A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives" *Chem Ber*, **1970**, *103*, 788-98.
- [159] C. Auge, S. David, C. Gautheron, A. Malleron, B. Cavaye "Preparation of six naturally occurring sialic acids with immobilized acylneuraminate pyruvate lyase" *New J. Chem.*, **1988**, *12*, 733-44.
- [160] O. Blixt, J.C. Paulson "Biocatalytic preparation of N-glycolylneuraminic acid, deaminoneuraminic acid (KDN) and 9-azido-9-deoxysialic acid oligosaccharides" *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, *345*, 687-690.
- [161] B. Parrish, T. Emrick "Soluble Camptothecin Derivatives Prepared by Click Cycloaddition Chemistry on Functional Aliphatic Polyesters" *Bioconjugate Chem.*, **2007**, *18*, 263-267.
- [162] E. Saxon, C.R. Bertozzi "Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction" *Science*, **2000**, *287*, 2007-2010.
- [163] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless "Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions" *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004-2021.
- [164] A. Porzelle, *Entwicklung einer reversiblen Festphasensynthese*. 2003, Technische Universität Darmstadt: Darmstadt.
- [165] C.F.H. Allen, G.H.W. McKee "Acridone" *Org. Synth.*, **1943**, *Coll. Vol. 2*, 15-17.
- [166] K.D. Johnstone, M. Dieckelmann, M.P. Jennings, I. Toth, J.T. Blanchfield "Chemo-enzymic synthesis of a trisaccharide-linked peptide aimed at improved drug-delivery" *Curr. Drug Delivery*, **2005**, *2*, 215-222.
- [167] H. Bradley, G. Fitzpatrick, W.K. Glass, H. Kunz, P.V. Murphy "Application of Ugi Reactions in Synthesis of Divalent Neoglycoconjugates: Evidence That the Sugars Are Presented in Restricted Conformation" *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 2629-2632.
- [168] F.M. Ibatullin, K.A. Shabalin "A Simple and Convenient Synthesis of Glycosyl Azides" *Synthetic Communications*, **2000**, *30*, 2819-2823.
- [169] W. Koenigs, E. Knorr "Some derivatives of grape sugars and galactose" *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1901**, *34*, 957-981.
- [170] B. Helferich, F. Wedemeyer "Zur Darstellung von Glucosiden aus Acetobromglucose" *liebigs Ann. Chem.*, **1949**, *563*, 139-145.

-
- [171] B. Helferich, J. Zirner "Zur Synthese von Tetraacetyl-hexosen mit freiem 2-Hydroxyl. Synthese einiger Disaccharide" *Chem. Ber.*, **1962**, 95, 2604-2611.
- [172] M. Hunsen, D.A. Long, C.R. D'Ardenne, A.L. Smith "Mild one-pot preparation of glycosyl bromides" *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340, 2670-2674.
- [173] S. Liu, R.N. Ben "C-Linked Galactosyl Serine AFGP Analogues as Potent Recrystallization Inhibitors" *Org. Lett.*, **2005**, 7, 2385-2388.
- [174] Y. Pan, Tiffany Ayani, Janos Nadas, S. Wen, Z. Guo* "Accessibility of *N*-acyl-D-mannosamines to *N*-acetyl-D-neuraminic acid aldolase" *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 2091-2100.
- [175] S. Huang, H. Yu, X. Chen "Disaccharides as sialic acid aldolase substrates: Synthesis of disaccharides containing a sialic acid at the reducing end" *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2007**, 46, 2249-2253.
- [176] A.J. Humphrey, C. Fremann, P. Critchley, Y. Malykh, R. Schauer, T.D.H. Bugg "Biological Properties of *N*-Acyl and *N*-Haloacetyl Neuraminic Acids: Processing by Enzymes of Sialic Acid Metabolism, and Interaction with Influenza Virus" *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 3175-3185.
- [177] R.R. Schmidt "New methods of glycoside and oligosaccharide syntheses - are there alternatives to the Koenigs-Knorr method?" *angew. Chem.*, **1986**, 98, 213-236.
- [178] D.C.M. Kong, M.v. Itzstein "The chemoenzymatic synthesis of 9-substituted 3,9-dideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acids" *Carbohydr. Res.*, **1998**, 305, 323-329.
- [179] C. Auge, C. Gautheron, S. David, A. Malleron, B. Cavaye, B. Bouxom "Sialyl aldolase in organic synthesis: from the trout egg acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid (KDN), to branched-chain higher ketoses as possible new chirons" *Tetrahedron*, **1990**, 46, 201-14.
- [180] C. Auge, B. Bouxom, B. Cavaye, C. Gautheron "Scope and limitations of the aldol condensation catalyzed by immobilized acylneuraminate pyruvate lyase" *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 2217-20.
- [181] C. Auge, S. David, C. Gautheron, A. Veyrieres "Synthesis with a immobilized enzyme of *N*-acetyl-9-O-acetyl-neuraminic acid, a sugar reported as a component of embryonic and tumor antigens" *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 2439-40.
- [182] L. Halcomb, W. Fitz, W.-H. Wong "Enzymatic Synthesis of 7-deoxy-*N*-acetyl-neuraminic acid and 7-O-methyl-*N*-neuaminic acid" *Tetrahedron Asymmetry*, **1994**, 5,
- [183] U. Kragl, A. Goedde, C. Wandrey, N. Lubin, C. Auge "New synthetic applications of sialic acid aldolase, a useful catalyst for KDO synthesis. Relation between substrate

-
- conformation and enzyme stereoselectivity" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1994**, 119-24.
- [184] A. Kuboki, H. Okazaki, T. Sugai, H. Ohta "An expeditious route to N-glycolylneuraminic acid based on enzyme-catalyzed reaction" *Tetrahedron*, **1997**, 53, 2387-2400.
- [185] M. Warwel, "*Untersuchungen zur chemo-enzymatischen Synthese von Sialokonjugaten*". 2001, Dissertation, Technische Universität Darmstadt: Darmstadt.
- [186] P.A. Veronesi, P.E.A. Rodriguez, E. Peschechera, S.L. Veronesi, *Preparation of sialic acid analogs for use as prodrugs which inhibit neuraminidase, hemagglutinin and structural M2 protein bearing viruses*. 2008, (Therapicon Srl, Italy). Application: WO
- WO. p. 62pp.
- [187] H.J. Gross, R. Brossmer "Enzymic introduction of a fluorescent sialic acid into oligosaccharide chains of glycoproteins" *Eur. J. Biochem.*, **1988**, 177, 583-9.
- [188] Y.G. Gololobov, L.F. Kasukhin "Recent advances in the staudinger reaction" *Tetrahedron* **1992**, 48, 1353-1406.
- [189] O. Blixt, S. Han, L. Liao, Y. Zeng, J. Hoffmann, S. Futakawa, J.C. Paulson "Sialoside Analogue Arrays for Rapid Identification of High Affinity Siglec Ligands" *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 6680-6681.
- [190] H.J. Gross, R. Brossmer "Asialo-alpha 1-acid glycoprotein resialylated with 9-amino-5-N-acetyl-D-neuraminic acid is resistant towards bacterial, viral and mammalian sialidases" *Glycoconjugate J.*, **1988**, 5, 411-17.
- [191] H. Yu, H.A. Chokhawala, A. Varki, X. Chen "Efficient chemoenzymatic synthesis of biotinylated human serum albumin-Sialoglycoside conjugates containing O-acetylated sialic acids" *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 2458-2463.
- [192] Y. Kajihara, T. Kamitani, R. Sato, N. Kamei, T. Miyazaki, R. Okamoto, T. Sakakibara, T. Tsuji, T. Yamamoto "Synthesis of CMP-9"-modified-sialic acids as donor substrate analogues for mammalian and bacterial sialyltransferases" *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342, 1680-1688.
- [193] H. Lindlar, R. Dubuis "Palladium Catalyst for Partial Reduction of Acetylenes" *Org. Synth.*, **1973**, Coll. Vol. 5, 880-882.
- [194] W.F. Vann, R.P. Silver, C. Abeijon, K. Chang, W. Aaronson, A. Sutton, C.W. Finn, W. Lindner, M. Kotsatos "Purification, properties, and genetic location of Escherichia coli cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase" *J Biol Chem*, **1987**, 262, 17556-62.

-
- [195] E.L. Kean, S. Roseman "The sialic acids. X. Purification and properties of cytidine 5'-monophosphosialic acid synthetase" *J Biol Chem*, **1966**, 241, 5643-50.
- [196] P.A. Lanzetta, L.J. Alvarez, P.S. Reinach, O.A. Candia "An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate" *Anal Biochem*, **1979**, 100, 95-7.
- [197] A. Fujita, C. Sato, A.-K. Munster-Kuehnelt, R. Gerardy-Schahn, K. Kitajima "Development of a simple and efficient method for assaying cytidine monophosphate sialic acid synthetase activity using an enzymatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide/oxidized nicotinamide adenine dinucleotide converting system" *Analy. Biochem.*, **2005**, 337, 12-21.
- [198] H. Yu, W. Ryan, H. Yu, X. Chen "Characterization of a Bifunctional Cytidine 5'-Monophosphate N-acetylneuraminic acid Synthetase Cloned from *Streptococcus Agalactiae*" *Biotechnol. Lett.*, **2006**, 28, 107-113.
- [199] Petrie "A High-Performance Liquid Chromatography Method for the Assay of Cytidine Monophosphate-Sialic Acid Synthetase" *Analy. Biochem.*, **1983**, 131, 153-159.
- [200] M. Gilbert, D.C. Watson, W.W. Wakarchuk "Purification and characterization of the recombinant CMP-sialic acid synthetase from *Neisseria meningitidis*" *Biotechnol. Lett.*, **1997**, 19, 417-420.
- [201] D. Nakata, A.-K. Munster, R. Gerardy-Schahn, N. Aoki, T. Matsuda, K. Kitajima "Molecular cloning of a unique CMP-sialic acid synthetase that effectively utilizes both deaminoneuraminic acid (KDN) and N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) as substrates" *Glycobiology*, **2001**, 11, 685-692.
- [202] D.J. Heyes, C. Levy, P. Lafite, I.S. Roberts, M. Goldrick, A.V. Stachulski, S.B. Rossington, D. Stanford, S.E.J. Rigby, N.S. Scrutton, D. Leys "Structure-based Mechanism of CMP-2-keto-3-deoxymanno-octulonic Acid Synthetase: Convergent Evolution of a Sugar-activating Enzyme with DNA/RNA Polymerases" *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 35514-35523.
- [203] L.E. Horsfall, A. Nelson, A. Berry "Identification and characterization of important residues in the catalytic mechanism of CMP-Neu5Ac synthetase from *Neisseria meningitidis*" *FEBS J.*, **2010**, 277, 2779-2790.
- [204] Jean-Louis Reymond, J.-M. Reymond "Enzyme assays: high-throughput screening, genetic selection, and fingerprinting" *Wiley-VCH*, **2006**,
- [205] M.J. Todd, J. Gomez "Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity?" *Anal. Biochem.*, **2001**, 296, 179-187.

-
- [206] R.G. Whittaker, M.K. Manthey, D.S. Le Brocq, P.J. Hayes "A microtiter plate assay for the characterization of serine proteases by their esterase activity" *Anal Biochem*, **1994**, *220*, 238-43.
- [207] F. Moris-Varas, Amit Shah, John Aikens, Neelesh P. Nadkarni, J.D. Rozzell, D.C. Demirjian* "Visualization of Enzyme-catalyzed Reactions using pH Indicators: Rapid Screening of Hydrolase Libraries and Estimation of the Enantioselectivity" *Bioorg. Med.Chem.*, **1999**, *7*, 2183-2188.
- [208] Yi Yao, Ming-Hua Wang, Kang-Yuan Zhao, C.-C. Wang* "Assay for enzyme activity by following the absorbance change of pH-indicators" *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1998**, *36*, 119-130.
- [209] Robert M. Rosenberg, Richard M. Herreid, George J. Piazza, M.H. O'Leary "Indicator Assay for Amino Acid Decarboxylases" *Analy. Biochem.*, **1989**, *181*, 59-65.
- [210] Eli Chapman, C.-H. Wong* "A pH Sensitive Colorimetric Assay for the High-Throughput Screening of Enzyme Inhibitors and Substrates: A Case Study Using Kinases" *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 551-555.
- [211] Chenghua Deng, R.R. Chen* "A pH-sensitive assay for galactosyltransferase" *Analy. Biochem.*, **2004**, *330*, 219-226.
- [212] E. Chapman, C.-H. Wong "A pH sensitive colorimetric assay for the high-throughput screening of enzyme inhibitors and substrates. A case study using kinases" *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 551-555.
- [213] R.M. Rosenberg, R.M. Herreid, G.J. Piazza, M.H. O'Leary "Indicator assay for amino acid decarboxylases" *Anal. Biochem.*, **1989**, *181*, 59-65.
- [214] H. Bisswanger "Practical Enzymology" *WILEY-VCH*, **2004**,
- [215] D.E. Koshland "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis" *Proc Natl Acad Sci USA*, **1958**, *44*, 98-104.
- [216] M.D. Chappell, R.L. Halcomb "Synthesis of a Six-Carbon Sialic Acid Using an Indium-Mediated Coupling" *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 2003-2005.
- [217] M. Warwel, W.-D. Fessner "Indium-Mediated Stereoselective Synthesis of Truncated, 6- and 7-Carbon Sialic Acids " *Synlett*, **2002**, *12*, 2104-2106.
- [218] E.S. Simon, M.D. Bednarski, G.M. Whitesides "Synthesis of CMP-NeuAc from N-acetylglucosamine: generation of CTP from CMP using adenylate kinase" *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 7159-63.
- [219] J. Thiem, P. Stangier "Preparative-enzymic formation of cytidine-5'-monophosphosialate by integrated cytidine-5'-triphosphate regeneration" *Liebigs Ann. Chem.*, **1990**, 1101-5.

-
- [220] C. Auge, C. Gautheron "Use of an immobilized aldolase in the first synthesis of a natural deaminated neuraminic acid" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 859-60.
- [221] M.-F. Karwaski, W.W. Wakarchuk, M. Gilbert "High-level expression of recombinant Neisseria CMP-sialic acid synthetase in Escherichia coli" *Protein Expression Purif.*, **2002**, 25, 237-240.
- [222] D.G. Comb, F. Shimizu, S. Roseman "Isolation of cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid" *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 5513-14.
- [223] H.J. Gross, A. Buensch, J.C. Paulson, R. Brossmer "Activation and transfer of novel synthetic 9-substituted sialic acids" *Eur. J. Biochem.*, **1987**, 168, 595-602.
- [224] H.J. Gross, R. Brossmer "Enzymic transfer of sialic acids modified at C-5 employing four different sialyltransferases" *Glycoconjugate J.*, **1995**, 12, 739-46.
- [225] E.M. Sletten, C.R. Bertozzi "Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality" *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, 48, 6974-6998.
- [226] A.A. Neves, H. Stöckmann, R.R. Harmston, H.J. Pryor, I.S. Alam, H. Ireland-Zecchini, D.Y. Lewis, S.K. Lyons, F.J. Leeper, K.M. Brindle "Imaging sialylated tumor cell glycans in vivo" *J. FASEB*, **2011**, 25, 2528-2537.
- [227] L.K. Mahal, K.J. Yarema, C.R. Bertozzi "Engineering Chemical Reactivity on Cell Surfaces Through Oligosaccharide Biosynthesis" *Science* **1997**, 276, 1125-1128.
- [228] M. Boyce, C.R. Bertozzi "Bringing chemistry to life" *Nat. Methods*, **2011**, 8, 638-642.
- [229] D. Rideout "Self-assembling cytotoxins " *Science*, **1986**, 233, 561-563.
- [230] V.W. Cornish, K.M. Hahn, P.G. Schultz "Site-Specific Protein Modification Using a Ketone Handle" *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 8150-8151.
- [231] J.C. Jewett, E.M. Sletten, C.R. Bertozzi "Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones" *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 3688-3690.
- [232] J.M. Baskin, J.A. Prescher, S.T. Laughlin, N.J. Agard, P.V. Chang, I.A. Miller, A. Lo, J.A. Codelli, C.R. Bertozzi "Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, 104, 16793-16797.
- [233] X. Ning, J. Guo, M.A. Wolfert, G.-J. Boons "Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions" *angew Chem Int Ed* **2008**, 47, 2253-2255.
- [234] P.V. Chang, J.A. Prescher, E.M. Sletten, J.M. Baskin, I.A. Miller, N.J. Agard, A. Lo, C.R. Bertozzi "Copper-free click chemistry in living animals" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2010**, 107, 1821-1826.

-
- [235] S.T. Laughlin, J.M. Baskin, S.L. Amacher, C.R. Bertozzi "In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish" *Science (Washington, DC, U. S.)*, **2008**, *320*, 664-667.
- [236] J.A. Prescher, D.H. Dube, C.R. Bertozzi "Chemical remodelling of cell surfaces in living animals" *Nature (London, U. K.)*, **2004**, *430*, 873-877.
- [237] L.A. Sylvers, J. Wower "Nucleic acid-incorporated azidonucleotides: Probes for studying the interaction of RNA or DNA with proteins and other nucleic acids" *Bioconjugate Chem.*, **1993**, *4*, 411-418.
- [238] H. Ovaa, P.F. van Swieten, B.M. Kessler, M.A. Leeuwenburgh, E. Fiebigler, A.M.C.H. van den Nieuwendijk, P.J. Galardy, G.A. van der Marel, H.L. Ploegh, H.S. Overkleeft "Chemistry in Living Cells: Detection of Active Proteasomes by a Two-Step Labeling Strategy" *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 3626-3629.
- [239] L.C. Bollheimer, R. Schwartz-Albiez, A. Sauer, H.J. Gross "Enzymic analysis of cell surface lactosaminyl glycans by flow cytometry" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, *215*, 30-40.
- [240] H.J. Gross, U. Sticher, R. Brossmer "A highly sensitive fluorometric assay for sialyltransferase activity using CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc as donor" *Anal. Biochem.*, **1990**, *186*, 127-34.
- [241] H.J. Gross, R. Brossmer "Characterization of human plasma sialyltransferase using a novel fluorometric assay" *Clin. Chim. Acta*, **1991**, *197*, 237-47.
- [242] M.G. Cabral, A.R. Piteira, Z. Silva, D. Ligeiro, R. Brossmer, P.A. Videira "Human dendritic cells contain cell surface sialyltransferase activity" *Immunol. Lett.*, **2010**, *131*, 89-96.
- [243] R. Brossmer, H.J. Gross "Fluorescent and photoactivatable sialic acids" *Methods Enzymol.*, **1994**, *247*, 177-93.
- [244] U. Schwarz, G. Wunderlich, R. Brossmer "Transfer of ^{131}I and fluoresceinyl sialic acid derivatives into the oligosaccharide chains of IgG: a new method for site-specific labeling of antibodies" *Nucl. Med. Biol.*, **1999**, *26*, 383-388.
- [245] M.S.T. Gonçalves "Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes" *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 190-212.
- [246] A.R. Mitchell "Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: A historical assessment" *Pept. Sci.*, **2008**, *90*, 175-184.
- [247] K. Sivakumar, F. Xie, B.M. Cash, S. Long, H.N. Barnhill, Q. Wang "A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes" *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 4603-4606.

-
- [248] P. Kele, G. Mezo, D. Achatz, O.S. Wolfdeis "Dual labeling of biomolecules by using click chemistry: a sequential approach" *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48*, 344-347.
- [249] A.J. Lampkins, E.J. O'Neil, B.D. Smith "Bio-orthogonal Phosphatidylserine Conjugates for Delivery and Imaging Applications" *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 6053-6058.
- [250] D.E. Achatz, G. Mezo, P. Kele, O.S. Wolfbeis "Probing the Activity of Matrix Metalloproteinase II with a Sequentially Click-Labeled Silica Nanoparticle FRET Probe" *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 2316-2320.
- [251] A.B. Neef, C. Schultz "Selective fluorescence labeling of lipids in living cells" *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48*, 1498-1500, S1498/1-S1498/25.
- [252] Y. Zhou, K. Liu, J.-Y. Li, Y. Fang, T.-C. Zhao, C. Yao "Visualization of Nitroxyl in Living Cells by a Chelated Copper(II) Coumarin Complex" *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 1290-1293.
- [253] R.P. Hangland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, in *Molecular Probes*. 2002, Eugene.
- [254] T. Konecsni, F. Kilár "Monitoring of the conjugation reaction between human serum transferrin and fluorescein isothiocyanate by capillary electrophoresis" *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1051*, 135-139.
- [255] V. Laird, M. Spiess "A Novel Assay to Demonstrate an Intersection of the Exocytic and Endocytic Pathways at Early Endosomes" *Exp. Cell Res.*, **2000**, *260*, 340-345.
- [256] N. Terasaki, H. Zhang, H. Yamada, C.-N. Xu "Mechanoluminescent light source for a fluorescent probe molecule" *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, **2011**, *47*, 8034-8036.
- [257] Q. Wang, S.A. Haughey, Y.-M. Sun, S.A. Eremin, Z.-F. Li, H. Liu, Z.-L. Xu, Y.-D. Shen, H.-T. Lei "Development of a fluorescence polarization immunoassay for the detection of melamine in milk and milk powder" *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, *399*, 2275-2284.
- [258] Y. Huang, R. Zhao, Y. Fu, Q. Zhang, S. Xiong, L. Li, R. Zhou, G. Liu, Y. Chen "Highly Specific Targeting and Imaging of Live Cancer Cells by Using a Peptide Probe Developed from Rationally Designed Peptides" *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 1209-1215.
- [259] A. Murata, S.-i. Sato, Y. Kawazoe, M. Uesugi "Small-molecule fluorescent probes for specific RNA targets" *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, **2011**, *47*, 4712-4714.
- [260] H. Yang, S. Vasudevan, C.O. Oriakhi, J. Shields, R.G. Carter "Scalable synthesis of lissamine rhodamine B sulfonyl chloride and incorporation of xanthene derivatives onto polymer supports" *Synthesis*, **2008**, 957-961.
- [261] T.E. Kreis "Preparation, assay, and microinjection of fluorescently labeled cytoskeletal proteins: actin, alpha-actinin, and vinculin" *Methods Enzymol*, **1986**, *134*, 507-19.

-
- [262] M. Wilchek, S. Spiegel, Y. Spiegel "Fluorescent reagents for the labeling of glycoconjugates in solution and on cell surfaces" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1980**, 92, 1215-22.
- [263] V. Agmon, S. Cherbu, A. Dagan, M. Grace, G.A. Grabowski, S. Gatt "Synthesis and use of novel fluorescent glycosphingolipids for estimating β -glucosidase activity in vitro in the absence of detergents and subtyping Gaucher disease variants following administration into intact cells" *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.*, **1993**, 1170, 72-9.
- [264] C. Neves, G. Byk, V. Escriou, F. Bussone, D. Scherman, P. Wils "Novel Method for Covalent Fluorescent Labeling of Plasmid DNA That Maintains Structural Integrity of the Plasmid" *Bioconjugate Chem.*, **2000**, 11, 51-55.
- [265] A.K. Thazhathveetil, S.-T. Liu, F.E. Indig, M.M. Seidman "Psoralen Conjugates for Visualization of Genomic Interstrand Cross-Links Localized by Laser Photoactivation" *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 18, 431-437.
- [266] N. Kamaly, T. Kalber, G. Kenny, J. Bell, M. Jorgensen, A. Miller "A novel bimodal lipidic contrast agent for cellular labelling and tumour MRI" *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 201-211.
- [267] M. Bai, M.B. Rone, V. Papadopoulos, D.J. Bornhop "A Novel Functional Translocator Protein Ligand for Cancer Imaging" *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 18, 2018-2023.
- [268] M. Izumi, G.-J. Shen, S. Wacowich-Sgarbi, T. Nakatani, O. Plettenburg, C.-H. Wong "Microbial Glycosyltransferases for Carbohydrate Synthesis: α -2,3-Sialyltransferase from *Neisseria gonorrhoeae*" *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 10909-10918.
- [269] Y. Saito, K. Matsumoto, S.S. Bag, S. Ogasawara, K. Fujimoto, K. Hanawa, I. Saito "C8-alkynyl- and alkylamino substituted 2'-deoxyguanosines: a universal linker for nucleic acids modification" *Tetrahedron*, **2008**, 64, 3578-3588.
- [270] M.S. Gibson, R.W. Bradshaw "The Gabriel Synthesis of Primary Amines" *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1968**, 7, 919-930.
- [271] M. Meldal, C.W. Tornøe "Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition" *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)*, **2008**, 108, 2952-3015.
- [272] G. Limberg, G.C. Slim, C.A. Compstonb, P. Stangierb, M.M. Palcicb, R.H. Furneaux "A New Assay For Sialyltransferases Using Fluorescein-Labelled Acceptors " *liebigs Ann.*, **1996**, 1773-1784.

-
- [273] J.Y. Zhao, N.J. Dovichi, O. Hindsgaul, S. Gosselin, M.M. Palcic "Detection of 100 molecules of product formed in a fucosyltransferase reaction" *Glycobiology*, **1994**, 4, 239-242.
- [274] Y.N. Zhang, X.C. Le, N.J. Dovichi, C.A. Compston, M.M. Palcic, P. Diedrich, O. Hindsgaul "Monitoring Biosynthetic Transformations of *N*-Acetylactosamine Using Fluorescently Labeled Oligosaccharides and Capillary Electrophoretic Separation" *Anal. Biochem.*, **1995**, 227, 368-376.
- [275] X. Le, C. Scaman, Y. Zhang, J. Zhang, N.J. Dovichi, O. Hindsgaul, M.M. Palcic "Analysis by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection of oligosaccharides produced from enzyme reactions " *J. Chromatogr. A*, **1995**, 716, 215-220.
- [276] X.C. Le, Y. Zhang, N.J. Dovichi, C.A. Compston, M.M. Palcic, R.J. Beever, O. Hindsgaul "Study of the enzymatic transformation of fluorescently labeled oligosaccharides in human epidermoid cells using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection" *J. Chromatogr. A*, **1997**, 781, 515-522.
- [277] A.R. Yeager, N.S. Finney "Synthesis of Fluorescently Labeled UDP-GlcNAc Analogues and Their Evaluation as Chitin Synthase Substrates" *J Org Chem*, **2005**, 40, 1269-1275.
- [278] S.L. Mosley, P.C. Rancy, D.C. Peterson, J. Vionnet, R. Saksena, W.F. Vann "Chemoenzymic synthesis of conjugate oligo-sialic acids" *Biocatal. Biotransform.*, **2010**, 28, 41-50.
- [279] J.A. Smith, R.M. West, M. Allen "Acridones and Quinacridones: Novel Fluorophores for Fluorescence Lifetime Studies" *Journal of Fluorescence*, **2004**, 14, 151-171.
- [280] J.-L. Reymond, T. Koch, J. Schroer, E. Tierney "A general assay for antibody catalysis using acridone as a fluorescent tag" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1996**, 93, 4251-4256.
- [281] S.H. Mihindukulasuriya, T.K. Morcone, L.B. McGown "Characterization of acridone dyes for use in four-decay detection in DNA sequencing" *electrophoresis*, **2003**, 24, 20-25.
- [282] B. Qiu, L. Guo, Z. Chen, Y. Chi, L. Zhang, G. Chen "Synthesis of *N*-4-butylamine acridone and its use as fluorescent probe for ctDNA" *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 24, 1281-1285.
- [283] S.A. Cosnier, R.S. Marks, E.R. Ionescu, *Electrochemical biosensor comprising an intercalator polymer and methods of detection of a DNA sequence*. 2011, (Universite Joseph Fourier - Grenoble 1, Fr.; Ben-Gurion University of the Negev Research and Development Authority; Centre National De La Recherche Scientifique - CNRS). Application: US

US. p. 12pp.

- [284] N. Guilbaud, S. Léonce, F. Tillequin, M. Koch, J.A. Hickman, A. Pierré "Acronycine derivatives as promising antitumor agents" *anti-cancer drugs*, **2002**, *13*, 445-449.
- [285] V.V.S. Rajendra Prasad, G.J. Peters, C. Lemos, I. Kathmann, Y.C. Mayur "Cytotoxicity studies of some novel fluoro acridone derivatives against sensitive and resistant cancer cell lines and their mechanistic studies" *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2011**, *43*, 217-224.
- [286] L.K. Basco, S. Mitaku, A.L. Skaltsounis, N. Ravelomanantsoa, F. Tillequin, M. Koch, J.L. Bras "In Vitro Activities of Furoquinoline and Acridone Alkaloids against *Plasmodium falciparum*" *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, *38*, 1169-1171.
- [287] R.P. Severino, R.V.C. Guido, E.F. Marques, D. Broemme, M.F.d.G.F. da Silva, J.B. Fernandes, A.D. Andricopulo, P.C. Vieira "Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V" *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 1477-1481.
- [288] A. Porzelle, W.-D. Fessner "Reversible substrate anchoring: NC-SPOS as a sustainable approach to solid-supported organic synthesis" *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2005**, *44*, 4724-4728.
- [289] M. Izumi, K. Fukase, S. Kusumoto "TMSCl as a Mild and Effective Source of Acidic Catalysis in Fischer Glycosidation and Use of Propargyl Glycoside for Anomeric Protection" *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **2002**, *66*, 211-214.
- [290] J.M.J. Ruiz, *Glycosidasen-vermittelte Glycosidsynthesen*, in *TU-Darmstadt*. 2002: Darmstadt.
- [291] M.A. Zolfigol "Silica sulfuric acid/ NaNO_2 as a novel heterogeneous system for production of thionitrites and disulfides under mild conditions" *tetrahedron* **2001**, *57*, 9509-9511.
- [292] B. Roy, B. Mukhopadhyay "Sulfuric acid immobilized on silica: an excellent catalyst for Fischer type glycosylation" *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 3783-3787.
- [293] J.M. Juárez Ruiz, G. Oßwald, M. Petersen, W.-D. Fessner "The "Natural Strategy" for the glycosidase-assisted synthesis of simple glycosides" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, *11*, 189-197.
- [294] H.B. Mereyala, S.R. Gurralla "A highly diastereoselective, practical synthesis of allyl, propargyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosides and allyl, propargyl heptaacetyl- β -D-lactosides" *Carbohydrate Research*, **1998**, *307*, 351-354.
- [295] G. García-Gómez, J.M. Moretó "Intramolecular Ni-Mediated Cyclizations with α, ω -Dienals" *European Journal of Organic Chemistry*, **2001**, *2001*, 1359-1369.

-
- [296] B. Vauzeilles, B. Dausse, S. Palmier, J.-M. Beau "A one-step β -selective glycosylation of N-acetyl glucosamine and recombinant chitooligosaccharides" *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 7567-7570.
- [297] V. Wittmann, D. Lennartz "Copper(II)-mediated activation of sugar oxazolines: Mild and efficient synthesis of beta -glycosides of N-acetylglucosamine" *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 1363-1367.
- [298] N. He, *Chemo-enzymatische Synthese fluoreszenzmarkierter LacNAc- Glycoside*. 2005, TU-Darmstadt: Darmstadt.
- [299] Y. Ichikawa, J.L.C. Liu, G.J. Shen, C.H. Wong "A highly efficient multienzyme system for the one-step synthesis of a sialyl trisaccharide: in situ generation of sialic acid and N-acetyllactosamine coupled with regeneration of UDP-glucose, UDP-galactose and CMP-sialic acid" *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 6300-2.
- [300] L. Hedbys, E. Johansson, K. Mosbach, P.-O. Larsson, A. Gunnarsson, S. Svensson "Synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-3-O- β -image-galactopyrano-syl-image-galactose by the sequential use of β -image-galactosidases from bovine testes and escherichia coli" *Carbohydr. Res.*, **1989**, 186, 217-223.
- [301] A. Vetere, M. Miletich, M. Bosco, S. Paoletti "Regiospecific glycosidase-assisted synthesis of lacto-*N*-biose I (Gal β 1 - 3GlcNAc) and 3'-sialyl-lacto-*N*-biose I (NeuAc α 2-3Gal- β 1-3GlcNAc)" *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 942-949.
- [302] A. D' Almeida, M. Ionata, V. Tran, C. Tellier, M. Dion, C. Rabiller "An expeditious and efficient synthesis of β -d-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-d-*N*-acetylglucosamine (lacto-*N*-biose) using a glycosynthase from *Thermus thermophilus* as a catalyst" *Tetrahedron Asymmetry*, **2009**, 20, 1243-1246.
- [303] G. Baisch, R. Ohrlein "Glycosyltransferase catalyzed assemblage of sialyl-Lewis-saccharopeptides" *Carbohydr. Res.*, **1998**, 312, 61-72.
- [304] H. Yu, V. Thon, K. Lau, L. Cai, Y. Chen, S. Mu, Y. Li, P.G. Wang, X. Chen "Highly efficient chemoenzymic synthesis of beta 1-3-linked galactosides" *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, **2010**, 46, 7507-7509.
- [305] M. Gilbert, M.-F. Karwaski, S. Bernatchez, N.M. Young, E. Taboada, J. Michniewicz, A.-M. Cunningham, W.W. Wakarchuk "The Genetic Bases for the Variation in the Lipooligosaccharide of the Mucosal Pathogen, *Campylobacter jejuni*" *J. Org. Chem.*, **2002**, 277, 327-337.
- [306] T.J. Morley, S.G. Withers "Chemoenzymatic Synthesis and Enzymatic Analysis of 8-Modified Cytidine Monophosphate-Sialic Acid and Sialyl Lactose Derivatives" *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 9430-9437.

-
- [307] Y. Ichikawa, G.C. Look, C.H. Wong "Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis" *Anal. Biochem.*, **1992**, 202, 215-38.
- [308] T. Yamamoto, M. Nakashizuka, H. Kodama, Y. Kajihara, I. Terada "Purification and characterization of a marine bacterial beta -galactoside alpha 2,6-sialyltransferase from *Photobacterium damsela* JT0160" *J. Biochem.*, **1996**, 120, 104-110.
- [309] C.-F. Teo, T.-S. Hwang, P.-H. Chen, C.-H. Hung, H.-S. Gao, L.-S. Chang, C.-H. Lin "Synthesis of Sialyl T N Glycopeptides -- Enzymatic Sialylation by alpha 2,6-Sialyltransferase from *Photobacterium damsela*" *Adv. Synth. Catal.*, **2005**, 347, 967-972.
- [310] H. Yu, H.A. Chokhawala, A. Varki, X. Chen "Efficient chemo-enzymatic synthesis of biotinylated human serum albumin-sialo-glycoside conjugates containing O-acetylated sialic acids" *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 2458-2463.
- [311] S. Muthana, H. Yu, S. Huang, X. Chen "Chemoenzymic synthesis of size-defined polysaccharides by sialyltransferase-catalyzed block transfer of oligosaccharides" *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 11918-11919.
- [312] A. Hyono, T. Mazda, H. Okazaki, K. Tadokoro, H. Ohshima "Analysis of enzyme-treated red blood cell surface and haemagglutination using a theory of soft particle electrophoresis" *vox sanguinis*, **2008**, 95, 131-136.
- [313] M.E.A. Pereira "A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*" *Science (Washington, D. C., 1883-)*, **1983**, 219, 1444-6.
- [314] T. Corfield "Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition" *Glycobiology*, **1992**, 2, 509.
- [315] T. Miyagi, S. Tsuiki "Rat-liver lysosomal sialidase: Solubilization, substrate specificity and comparison with the cytosolic sialidase" *Eur J Biochem*, **1984**, 141, 75.
- [316] N.M. Useh, J.O. Ajanusi, K.A.N. Esievo, A.J. Nok "Characterization of a sialidase (neuraminidase) isolated from *Clostridium chauvoei* (Jakari strain)" *Cell biochem funct*, **2006**, 24, 347-352.
- [317] L. Campo Vanessa, I. Carvalho, S. Allman, G. Davis Benjamin, A. Field Robert "Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycosyl-amino acids and glycopeptides related to *Trypanosoma cruzi* mucins" *Org Biomol Chem*, **2007**, 5, 2645-57.
- [318] P. Roggentin, B. Rothe, F. Lottspeich, R. Schauer "Cloning and sequencing of a *Clostridium perfringens* sialidase gene" *FEBS Lett.*, **1988**, 238, 31-34.
- [319] L. Warren "The thiobarbituric acid assay of sialic acids" *J Biol Chem*, **1959**, 234, 1971-5.

-
- [320] F. Amat-Guerri, A. Costela, J.M. Figuera, F. Florid, R. Sastre "Laser action from rhodamine 6G-doped poly (2-hydroxyethyl methacrylate) matrices with different crosslinking degrees " *chem. phys. lett.*, **1993**, 209, 352-356.
- [321] I.L. Arbeloa, P.R. Ojeda "Molecular Forms of Rhodamine B" *Chem. Phys. Lett.*, **1981**, 79, 347-350.
- [322] N.J. Agard, J.A. Prescher, C.R. Bertozzi "A strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems" *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15046-15047.
- [323] M.J. Baskin, R.C. Bertozzi "Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems" *QSAR Comb. Sci.*, **2007**, 26, 1211-1219.
- [324] J.-F. Lutz "Kupferfreie Azid-Alkin-Cycloadditionen: Erkenntnisse und Perspektiven" *Angew. Chem.*, **2008**, 120, 2212-2214.
- [325] M. Köhn, R. Breinbauer "Die Staudinger-Ligation - ein Geschenk für die Chemische Biologie" *Angew. Chem.*, **2004**, 116, 3168-3178.
- [326] C.-H. Lee, C.E. Frasch "Quantification of Bacterial Polysaccharides by the Purpald Assay: Measurement of Periodate-Generated Formaldehyde from Glycol in the Repeating Unit" *anal. Biochem.*, **2001**, 296, 73-82.
- [327] A.K. Bhattacharjee, H.J. Jennings, C.P. Kenny, A. Martin, I.C. Smith "Structural determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W-135, and BO1" *Can J Biochem*, **1976**, 54, 1-8.
- [328] S. Hanson, M. Best, M.C. Bryan, C.-H. Wong "Chemoenzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoproteins" *Trends Biochem. Sci.*, **2004**, 29, 656-663.
- [329] M.J. Kiefel, M. von Itzstein "Recent Advances in the Synthesis of Sialic Acid Derivatives and Sialyl-Mimetics as Biological Probes" *Chem. Rev. (Washington, D. C.)*, **2002**, 102, 471-490.
- [330] A.M. Daines, B.A. Maltman, S.L. Flitsch "Synthesis and modifications of carbohydrates, using biotransformations" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, 8, 106-113.
- [331] D. Yi, "N.N.". in Vorbereitung, Dissertation, Technische Universität Darmstadt: Darmstadt.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.
